

*Alla mia famiglia.
A mio padre e mia madre
che mi hanno sostenuta in questi tre anni e per
i sacrifici fatti e al “don pacifico” di mio fratello
che mi ha sopportata fino ad adesso.
A Ermanno che mi ha spronata e motivata
e a tutti quelli che mi sono stati vicini.
A tutti voi grazie.*

Paola

INDICE

1 – INTRODUZIONE.....	pag.5
1.1 - PRODUZIONE DI NANOPARTICELLE E FLUIDI	
MAGNETICI.....	pag.5
1.2 - L'IPERtermia MAGNETO FLUIDA.....	pag.6
2 – RICHIAMI DI BIOLOGIA.....	pag.7
2.1 - STRUTTURA DEL DNA.....	pag.7
2.2 - STRUTTURA DEL SANGUE.....	pag.8
2.3 - IL RETICOLO ENDOPLASMATICO.....	pag.9
2.4 - I MITOCONDRI.....	pag.9
2.5 - TERRENI DI COLTURA E SIERI.....	pag.9
2.6 - CITOTOSSICITÀ IN VITRO.....	pag.10
2.7 - CITOTOSSICITÀ IN VIVO.....	pag.10
3 – FATTORI CHE INFLUENZANO LA CITOTOSSICITÀ.....	pag.11
3.1 - RAPPORTO r.....	pag.11
3.2 - TIPI DI RIVESTIMENTO.....	pag.11
3.3 - FORMA DELLE NANOPARTICELLE.....	pag.14
3.4 - DIAMETRO IDRODINAMICO.....	pag.14
3.5 - DIMENSIONI DELLE NANOPARTICELLE.....	pag.16
4 – TEST PER LA VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ	
DI NANOPARTICELLE.....	pag.17
4.1 - SAGGIO MTT.....	pag.17
4.2 - TEST DELLA COMETA.....	pag.18
4.3 - TEST SUL CICLO DI VITA CELLULARE / TEST	
IN VITRO.....	pag.19
4.4 - TUNEL TEST.....	pag.19
4.5 - TEST IN VIVO.....	pag.19
4.6 - TEST LDH.....	pag.20
4.7 - TEST CON IL BLU TRIPANO.....	pag.21
5 – INTERAZIONI DELLE NANOPARTICELLE CON IL	
SISTEMA IMMUNITARIO.....	pag.22
5.1 - EMOLISI.....	pag.22
5.2 - TROMBOGENICITÀ.....	pag.23
5.3 - ATTIVAZIONE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.....	pag.23
5.4 - INTERAZIONE CON LE PROTEINE PLASMATICHE.....	pag.23

5.5 - ASSORBIMENTO DI MNP DA PARTE DEI MACROFAGI...	pag.24
5.6 - SAGGI PER STUDIARE L'INTERAZIONE DELLE NANOPARTICELLE CON IL SISTEMA IMMUNITARIO.....	pag.26
6 – CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE IN ALCUNI CASI PARTICOLARI.....	pag.32
6.1 - CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE PER CELLULE DI ADENOCARCINOMA MAMMARIO.....	pag.33
6.2 - CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE PER CELLULE ENDOTELIALI AORTICHE UMANE.....	pag.38
6.3 - CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE PER CELLULE POLMONARI UMANE.....	pag.42
6.4 - CONFRONTO TRA GLI STUDI ANALIZZATI: ANALOGIE E DIFFERENZE.....	pag.50
7 – CONCLUSIONI.....	pag.52
8 – RIFERIMENTI.....	pag.54

1 - INTRODUZIONE

Le nanoparticelle di ossido di ferro hanno trovato numerose potenziali applicazioni nella biomedicina come, per esempio, il trasporto controllato di farmaci, come mezzo di contrasto per la risonanza magnetica e l'ipertermia. Viene utilizzato questo tipo di nanoparticelle perché presentano una buona biocompatibilità e perché possono essere eventualmente guidate verso il sito d'applicazione interessato attraverso l'applicazione di un campo magnetico esterno. Nei prossimi paragrafi vengono approfondite le metodologie di sintesi delle particelle magnetiche e spiegato che cos'è l'ipertermia.

1.1– PRODUZIONE DI NANOPARTICELLE E FLUIDI MAGNETICI

Le nanoparticelle magnetiche sono materiali particolari ingegnerizzati con diametro inferiore ai 250 nm composti da elementi magnetici, come il ferro o il cobalto, che possono essere utilizzate sotto l'effetto di un campo magnetico esterno ad esempio per trasportare un farmaco, scaldare un tessuto o fare da mezzo di contrasto [2].

Molti metodi vengono utilizzati per la sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro, di seguito vengono citati i principali:

- **ABLAZIONE LASER:** con questa tecnica le nanoparticelle vengono prodotte grazie alla rottura del materiale magnetico tramite aumento locale della temperatura mediante energia luminosa [13];
- **DECOMPOSIZIONE AD ALTA TEMPERATURA DEL PRECURSORE ORGANICO:** in questa tecnica una soluzione contenente ossido di ferro e altre sostanze viene riscaldata ad una determinata temperatura in modo da far evaporare le altre sostanze e permettere l'aggregazione dell' Fe_3O_4 in nanoparticelle [13];
- **MACINAZIONE MECCANICA:** questa tecnica è in grado di produrre nanoparticelle con dimensioni che vanno da un paio di decine a diverse centinaia di nanometri di diametro. Tuttavia, le nanoparticelle prodotte in questo modo hanno una distribuzione dimensionale relativamente ampia e possiedono una morfologia molto varia; inoltre, possono contenere significative quantità di impurità derivanti dal mezzo con cui è eseguita la macinazione e difetti dovuti al metodo stesso [13].

Il metodo di coprecipitazione chimica è la tecnica più utilizzata per produrre nanoparticelle disperse in acqua (fluidi magnetici). Nella coprecipitazione vengono utilizzati sali precursori sciolti in acqua e fatti precipitare a pH basico in forma di nanocristalli secondo la seguente reazione [13]:



1.2 – L'IPERtermia MAGNETO FLUIDA

L'ipertermia magneto fluida consiste nel riscaldamento locale di un tessuto tramite la somministrazione di nanoparticelle magnetiche che vengono fatte “agitare” attraverso l'applicazione di un campo magnetico esterno tempovariante.

Nell'ipertermia le nanoparticelle, poste sotto l'azione di un campo magnetico esterno, possono essere usate per riscaldare tessuti tumorali fornendo energia termica in grado di distruggere le cellule; oppure possono essere utilizzate come agenti di miglioramento per la chemioterapia o la radioterapia dove un moderato aumento della temperatura del tessuto porta a una maggiore distruzione di cellule cancerogene rispetto a quello che si ha con le sole terapie convenzionali. In questo tipo di trattamento le MNP¹ vengono disperse in un fluido che funge da carrier e iniettate direttamente nella zona da trattare, oppure somministrate attraverso il sistema circolatorio nel caso in cui siano ricoperte da uno specifico anticorpo tumorale che le porta direttamente nel sito di applicazione; successivamente vengono sottoposte ad un campo magnetico alternato che causa il riscaldamento delle particelle.

La magneto fluido ipertermia coinvolge particelle magnetiche disperse per tutto il tessuto bersaglio e poi viene applicato un campo magnetico alternato di intensità e frequenza sufficienti a causare il riscaldamento delle particelle.

La magneto fluido ipertermia permette maggiormente di mirare selettivamente le cellule tumorali. Potrebbe quindi essere possibile ridurre le dosi di chemioterapia e radioterapia, ottimizzare gli effetti terapeutici e ridurre gli effetti tossici derivanti dalle normali tecniche di trattamento di tumori [2].

Per questo tipo di applicazione è importante conoscere la temperatura che raggiungono il tessuto trattato e quelli circostanti, il campo magnetico che deve essere applicato e conoscere la citotossicità delle MNP.

Nei prossimi capitoli verrà analizzato quest'ultimo aspetto.

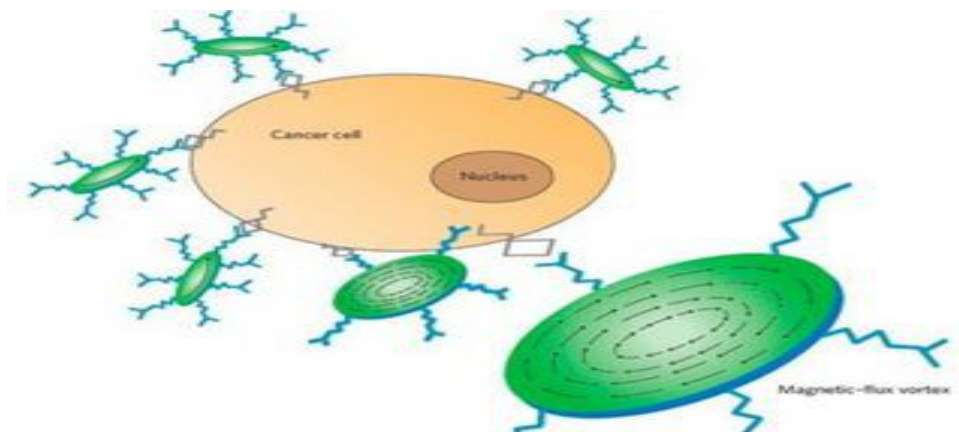


Figura 1: Nanoparticelle rivestite che si legano ad una cellula tumorale

¹ MNP = nanoparticelle magnetiche

2 - RICHIAMI DI BIOLOGIA

2.1 - STRUTTURA DEL DNA

Gli acidi nucleici (DNA e RNA) hanno il ruolo di preservare e trasmettere l'informazione genetica. Gran parte dello sviluppo fisico di un organismo durante la sua vita è dipendente da quanto codificato negli acidi nucleici in quanto questi sono gli unici composti che contengono le informazioni per la corretta sintesi delle proteine.

Il DNA, o acido deossiribonucleico, è un polinucleotide le cui unità monomeriche sono i NUCLEOTIDI, i quali sono composti da un fosfato, un aldopentoso (zucchero) e una base debole eterociclica.



Figura 2: Struttura di un nucleotide

Nel polimero i legami tra i diversi nucleotidi sono realizzati da gruppi fosfato che formano legami con il gruppo OH del carbonio 5' di un deossiribosio e con il gruppo OH del carbonio in 3' di un altro deossiribosio.

La catena polinucleotidica (filamento) possiede un verso, infatti il DNA cresce dall'estremità 5' verso l'estremità 3' come presentato in Figura 3.

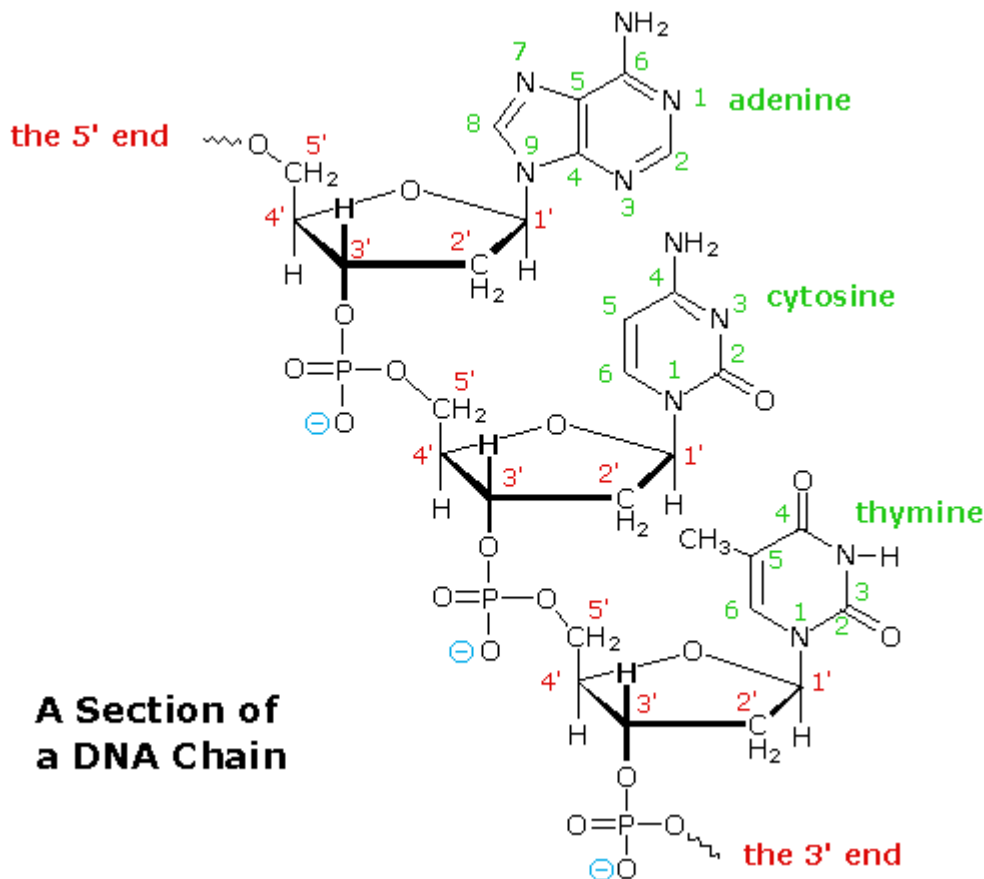


Figura 3: Sezione di una catena di DNA

Le porzioni idrofiliche di fosfato e deossiribosio dell'elica si trovano all'esterno ad interagire favorevolmente con il mezzo acquoso mentre le basi idrofobiche si trovano all'interno [12].

La forma in cui gli acidi nucleici si trovano nel nucleo della cellula eucariote è rappresentata dalla CROMATINA. Quest'ultima è una componente estremamente importante in quanto è responsabile di:

- *Impaccamento del DNA;*
- *Rafforzamento del DNA per permettere la mitosi;*
- *Prevenire danni al DNA;*
- *Controllare la replicazione del DNA [13].*

2.2 - STRUTTURA DEL SANGUE

Il sangue è un tipo particolare di tessuto connettivo formato da:

- PLASMA (composto da acqua, sali e proteine);
- FRAZIONE CORPUSCOLARE.

La frazione corpuscolare è formata principalmente da tre tipi di cellule che sono:

- ERITROCITI;
- LEUCOCITI;

- PIASTRINE.

Gli eritrociti o globuli rossi compongono il 99% della popolazione cellulare del sangue e sono privi di nucleo e mitocondri. Hanno una forma a disco biconcavo che risulta essere la forma ideale per massimizzare l'area superficiale per lo scambio dei gas. Al loro interno gli eritrociti contengono l'emoglobina, una proteina quaternaria contenente atomi di ferro necessaria per il trasporto di ossigeno nel sangue.

I leucociti o globuli bianchi sono cellule che hanno funzione di degradazione e smaltimento e il loro compito principale è quello di difesa dell'organismo.

Le piastrine sono elementi corpuscolari molto più piccoli di eritrociti e leucociti e sono responsabili della coagulazione del sangue nel caso di lesione delle pareti vascolari [1].

2.3– IL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Il reticolo endoplasmatico è un organello cellulare responsabile della sintesi di lipidi (reticolo endoplasmatico liscio) e proteine (reticolo endoplasmatico rugoso). Il reticolo endoplasmatico rugoso all'esterno presenta ribosomi che sono responsabili della sintesi delle proteine. Le proteine prodotte dal reticolo endoplasmatico rugoso sono destinate:

1. Ad essere espulse dalla cellula;
2. A formare la membrana cellulare;
3. A restare all'interno della cellula ma racchiuse dentro a vescicole [12].

2.4 – I MITOCONDRI

I mitocondri sono organelli cellulari responsabili della produzione di energia (ATP) e della respirazione cellulare. Il mitocondrio è delimitato da due membrane: una esterna e liscia poco selettiva e una interna con creste mitocondriali molto selettiva. All'interno della seconda membrana si trova della matrice dove sono dispersi ribosomi e del materiale genetico non delimitato da membrana [12].

2.5 – TERRENI DI CULTURA E SIERI

Esistono diversi terreni di coltura per coltivare cellule in vitro. I più utilizzati sono:

- MEM (Minimum Essential Medium);
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

Il MEM è un terreno di coltura che contiene:

- *Ammminoacidi*;
- *Vitamine, se il contenuto di siero è basso*;
- *Gas disciolti*;
- *Ioni, per mantenere costante il potenziale di membrana cellulare e il pH*

uguale a 7,4;

- *Glucosio o glutammina;*
- *Antibiotici, per prevenire il contagio di batteri;*
- *Rosso fenolo, usato come indicatore di pH poiché la crescita ottimale delle cellule si ha con pH uguale a 7,4. Il rosso fenolo è giallo se il pH è uguale a 6,5, arancio se il pH è 7, rosso se il pH è 7,6 e violaceo se il pH è maggiore di 7,6.*

Il DMEM è un tipo di terreno di coltura cellulare che contiene gli stessi fattori del MEM con l'aggiunta di un maggior quantitativo di vitamine e amminoacidi.

Il siero più utilizzato come aggiunta al terreno di coltura è il siero bovino fetale (FBS/FCS). Il siero stimola le funzioni di crescita cellulari tramite fattori ormonali, favorisce l'adesione al substrato e provvede al trasporto di ormoni minerali e lipidi [13].

2.6 - CITOTOSSICITÀ IN VITRO

La citotossicità in vitro valuta i danni biologici acuti che un determinato composto o dispositivo medico provoca alle cellule.

Le cellule di mammifero coltivate in vitro su mezzo nutriente vengono messe a contatto con il composto in esame oppure con le sostanze che il composto rilascia in ambiente biologico e si valuta il tasso di mortalità delle cellule. Se la vitalità delle cellule è minore dell' 80%, il composto o dispositivo in esame viene considerato tossico [1].

2.7 - CITOTOSSICITÀ IN VIVO

La citotossicità in vivo è una valutazione dei danni biologici che un determinato composto o dispositivo medico provoca su una cavia animale.

Il composto in esame viene posto direttamente a contatto con l'animale e viene valutato l'insorgere di irritazione e/o sensibilizzazione al composto oppure nel caso di iniezione o impianto viene valutata la percentuale di peso perso dalla cavia; infatti la perdita di peso è proporzionale alla tossicità del composto in esame perché quando una sostanza è tossica abbiamo lisi o morte cellulare che in vivo si manifesta come perdita di peso da parte della cavia. Se la perdita di peso dell'animale è superiore al 20% significa che ci sono effetti citotossici rilevanti [1].

3 - FATTORI CHE INFLUENZANO LA CITOTOSSICITÀ

Ci sono diversi fattori che influenzano la citotossicità delle nanoparticelle; i principali sono:

- RAPPORTO r [3];
- TIPO DI RIVESTIMENTO [6];
- FORMA DELLE NANOPARTICELLE [3];
- DIAMETRO IDRODINAMICO DELLE NANOPARTICELLE [3,4];
- DIMENSIONE DELLE NANOPARTICELLE [3].

3.1 - RAPPORTO r

Il rapporto r è dato dalla divisione tra la massa del materiale di ricoprimento (m_r) e la massa di ferro delle nanoparticelle (m_{Fe}):

$$r = \frac{m_r}{m_{Fe}}$$

Il valore di questo rapporto può variare tra: 0 (nessun materiale di ricoprimento) e 5 (massimo rapporto possibile).

Come tutti gli altri fattori anche il rapporto r va scelto in base al sito di applicazione delle nanoparticelle; infatti in base alla zona da trattare verrà scelta una dimensione piuttosto che un'altra.

Da alcuni studi si è notato che all'aumentare di questo rapporto si riduce la tossicità dovuta alle nanoparticelle in quanto l'aumento di r porta ad una riduzione dei siti ossidativi della magnetite e di conseguenza diminuisce la probabilità di ossidare, quindi danneggiare, il DNA. È importante però ricordare che r non può aumentare troppo in quanto, in ambiente biologico, l'attivazione del sistema del complemento è direttamente proporzionale all'aumento della grandezza delle particelle.

Va comunque tenuto presente che la sola magnetite è ben tollerata dall'organismo in quanto l'ossidazione del DNA che causa è minima; infatti la magnetite in ambiente biologico mantiene una vitalità cellulare circa uguale all' 80%. Per questo la scelta del rivestimento è molto importante perché si rischia di rendere le nanoparticelle rivestite più citotossiche rispetto a quelle non rivestite [3].

3.2 – TIPI DI RIVESTIMENTO

Senza rivestimento le nanoparticelle hanno una superficie idrofobica e una maggiore propensione ad agglomerarsi. Una superficie di rivestimento opportuna permette alle nanoparticelle di essere disperse a formare un ferro fluido omogeneo e di aumentare la stabilità delle particelle stesse.

Vengono utilizzati diversi tipi di materiali di rivestimento per modificare la superficie delle particelle di ossido di ferro:

- POLIMERI ORGANICI, come destrano, chitosano, glicole polietilenico, polisorbato, polianilina e oleato di sodio;
- METALLI INORGANICI, come l'oro;
- OSSIDI INORGANICI, come silice e carbone;
- TENSIOATTIVI ORGANICI/ACIDO DIMERCAPTOSUCCINICO;
- MOLECOLE BIOATTIVE e STRUTTURE, come liposomi, peptidi e leganti/recettori [6].

- POLIMERI ORGANICI

Tradizionalmente per preparati clinici di nanoparticelle vengono utilizzati dastrani organici biodegradabili e derivati dei carboidrati a causa del loro uso comune nel plasma artificiale e per la loro alta affinità con gli ossidi di ferro. Però i rivestimenti polimerici sono instabili a temperature elevate e non sono idonei a rivestire nanoparticelle reattive a causa della scarsa stabilità in aria e suscettibilità alla lisciviazione² in ambiente acido.

Il glicole polietilenico (PEG) è un polimero ampiamente utilizzato per la sua idrofilia e la bassa antigenicità; inoltre i rivestimenti in PEG prevengono dall'opsonizzazione e dall'assorbimento da parte dei macrofagi aumentando così la circolazione di nanoparticelle in vivo. Le nanoparticelle ricoperte con PEG vengo assorbite efficientemente dalle cellule attraverso endocitosi in fase liquida e attraverso affinità anfifilica³ di doppi strati lipidici sulle membrane plasmatiche. Queste qualità però aumentano il dosaggio di ferro nelle cellule e rendono le nanoparticelle tossiche.

L'alcol polivinilico (PVA) ha eccellenti proprietà filmogene, emulsionanti e adesive; cioè: stabilizza le nanoparticelle in soluzione, è in grado di aderire e legarsi ai recettori cellulari ed una volta posto sopra le particelle diventa resistente ed elastico; però presenta una scarsa persistenza in vivo e le PVA-Fe₃O₄ tendono a creare agglomerati di nanoparticelle che portano all'attivazione del sistema del complemento [6].

- METALLI INORGANICI

Metalli preziosi, come l'oro, vengono utilizzati per proteggere nanoparticelle di ferro dall'ossidazione in quanto creano particelle stabili. Le nanoparticelle rivestite d'oro presentano: ottime proprietà ottiche, biocompatibilità, eccezionale capacità di funzionalizzazione e stabilità in ambiente acido e neutro. Problema di questo tipo di rivestimento è che indebolisce le proprietà magnetiche delle particelle magnetiche.

2 Lisciviazione o estrazione-solido liquido = processo che consiste nella separazione di uno o più componenti solubili da una massa solida mediante un solvente

3 Affinità anfifilica = le sostanze anfifiliche sono quelle sostanze che presentano sia siti idrofobici sia idrofilici come appunto la membrana cellulare. L'affinità anfifilica tra la membrana cellulare e un'altra sostanza sfrutta appunto la bivalenza di entrambe per far entrare la sostanza all'interno della membrana cellulare.

In Figura 4 sono rappresentate nanoparticelle ricoperte d'oro [6].

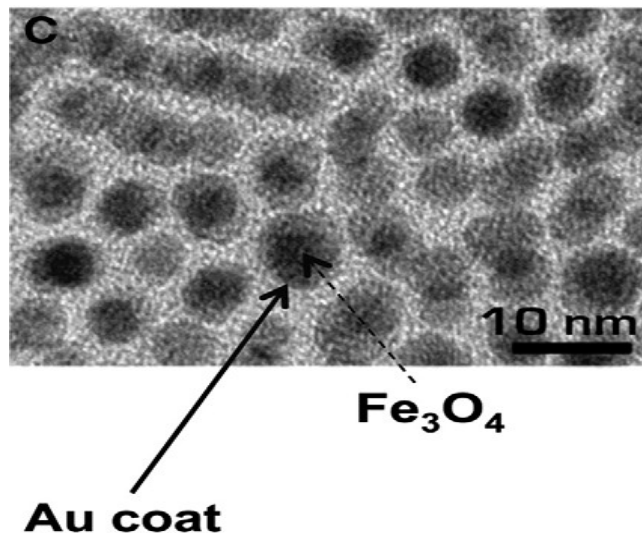


Figura 4: Nanoparticelle di ossido di ferro ricoperte d'oro [6]

- OSSIDI INORGANICI

Le nanoparticelle ricoperte di silice grazie alla loro carica superficiale negativa sono stabili in ambiente acquoso. Queste forniscono un buon controllo delle interazioni tra particelle ed inoltre la carica negativa superficiale fornisce un sito per legare in modo covalente leganti e/o peptidi. Il problema della silice è che essendo un materiale amorfo è difficile ricoprire le nanoparticelle con questo materiale ed inoltre a causa della sua carica superficiale è in grado di ossidare il DNA e portare perciò alla sua rottura [6].

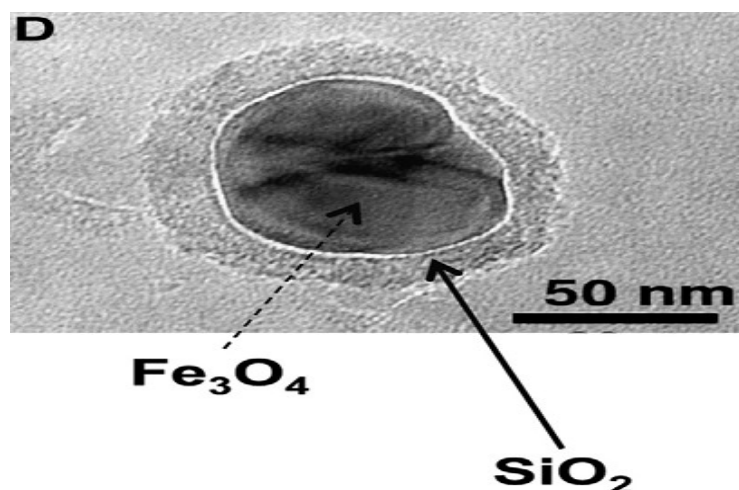


Figura 5: Nanoparticella ricoperta con silice [6]

- ACIDO DIMERCAPTOSUCCINICO (DMSA)

L'acido dimercaptosuccinico (DMSA) è un tensioattivo con carica negativa. Il DMSA previene l'aggregazione di nanoparticelle ed interagisce fortemente con le cariche positive delle regioni plasmatiche. Le nanoparticelle rivestite con questo tensioattivo vengono assorbite efficientemente dalle cellule attraverso endocitosi; però a causa della dispersione dei siti anionici nel citoplasma le nanoparticelle ricoperte con DMSA si ammassano sulla superficie cellulare prima della loro endocitosi.

I tensioattivi a carica negativa, come il DMSA, una volta entrati all'interno delle cellule non interagiscono favorevolmente con il DNA e perciò l'ossidazione e distruzione di quest'ultimo è limitata. Differente è la situazione con i tensioattivi a carica positiva che anche loro interagiscono favorevolmente con l'ambiente acquoso ma una volta entrati all'interno delle cellule ossidano il DNA portando ad una maggiore tossicità [6].

- MOLECOLE BIOATTIVE E STRUTTURE

Le nanoparticelle vengono rese attive attraverso il legame di peptidi, acidi nucleici, piccole molecole e a volte anticorpi. Questi tipi di rivestimento permettono di “indirizzare” le nanoparticelle verso determinati tipi di cellule [6].

3.3 – FORMA DELLE NANOPARTICELLE

La citotossicità delle particelle magnetiche è influenzata dalla forma che quest'ultime hanno. La tossicità aumenta a seconda che le cellule entrino in contatto rispettivamente con nanoperline, nanovermi o nanosfere; questo perché le nanosfere hanno, a parità di quantitativo di magnetite, una maggiore superficie di contatto con l'ambiente esterno rispetto alle nanoperline e ai nanovermi e questo porta ad un aumento dei siti ossidativi. L'aumento dei siti ossidativi delle nanoparticelle comporta ad una maggiore probabilità di ossidare il DNA, portando alla morte cellulare, ed un aumento della fagocitosi da parte dei macrofagi trascinando così le nanoparticelle lontano dal sito di applicazione previsto [3].

3.4 – DIAMETRO IDRODINAMICO DELLE NANOPARTICELLE

Una particella dispersa in un mezzo fluido si muove se sulla sua superficie è attaccato uno strato dipolare elettrico sottile. Lo spessore di questo strato sommato al raggio della particella in esame viene detto diametro idrodinamico e dipende da diversi fattori tra cui anche la conduttività elettrica del fluido nel quale è immersa la particella. In Figura 6 è rappresentato quanto appena descritto [3].

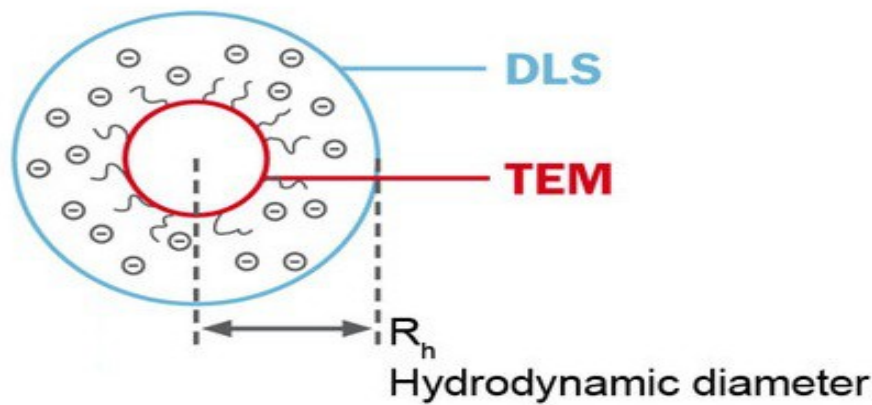


Figura 6: Diametro idrodinamico [13]

Da alcuni studi sperimentali sulla citotossicità delle nanoparticelle si è notato che: all'aumentare della dimensione idrodinamica di quest'ultime aumenta la tossicità cellulare poiché lo strato dipolare tipico del diametro idrodinamico non solo aumenta la probabilità che le nanoparticelle vengano fagocitate dai macrofagi ma a causa della carica può portare alla distruzione del DNA, della membrana eritrocitica e ad un aumento della trombogenicità [3].

Il raggio idrodinamico viene calcolato attraverso l'equazione di Stokes-Einstein che è:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Dove:

- D è il coefficiente di diffusione di materia;
- k_B è la costante di Boltzmann;
- T è la temperatura espressa in gradi Kelvin;
- η è la viscosità del fluido;
- r è il raggio della particella in esame.

Il coefficiente di diffusione di materia o diffusività di materia è il potenziale scalare della velocità delle particelle nel mezzo all'interno del quale esse si trovano. La diffusività è definita come l'opposto dell'inverso del gradiente della velocità; cioè è legata alla velocità come l'energia cinetica è legata alla forza:

$$D = -\nabla^{-1} \vec{v}(x, y, z)$$

Se la velocità è uniforme il coefficiente di diffusione diventa una costante nelle coordinate spaziali, cioè:

$$\nabla^2 D = 0$$

Poiché D viene ricavato sperimentalmente colpendo la soluzione con un raggio laser il raggio idrodinamico viene calcolato facilmente dalla formula di Stokes-Einstein. Il rapporto $\frac{1}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$ viene anche chiamato mobilità della particella ed è indicato con il simbolo μ [13].

3.5 – DIMENSIONE DELLE NANOPARTICELLE

La dimensione delle nanoparticelle è data dalla dimensione del cuore ferromagnetico più lo spessore del rivestimento esterno. Importante è valutare qual è la dimensione delle nanoparticelle più opportuna per evitare effetti citotossici.

Alcuni studi sperimentali hanno dimostrato che la dimensione delle nanoparticelle ideale va da qualche decina di micron a qualche centinaio di nanometri a seconda del sito d'applicazione previsto. Infatti per nanoparticelle iniettate per via endovenosa vengono privilegiate quelle di dimensione più piccola perché hanno minore probabilità di essere fagocitate e di attivare la cascata emocoagulativa [5]; nel caso di nanoparticelle somministrate per inalazione vengono privilegiate nanoparticelle più grandi perché particelle più piccole di 100 nm portano alla rottura dei mitocondri e alla morte cellulare senza infiammazione, questo perché le nanoparticelle troppo piccole portano alla rottura del tessuto epiteliale polmonare che porta all'attivazione e reclutamento dei macrofagi [10].

4 - TEST PER LA VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DELLE NANOPARTICELLE

Per valutare la citotossicità delle nanoparticelle di ossido di ferro vengono utilizzati diversi tipi di test, i principali sono:

- SAGGIO MTT [2];
- TEST DELLA COMETA [2];
- TEST SUL CICLO DI VITA CELLULARE/TEST IN VITRO [2];
- TUNEL TEST [2];
- TEST IN VIVO [2];
- TEST LDH [11];
- TEST CON IL BLU TRIPANO [11].

4.1 - SAGGIO MTT

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l' MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) in FORMAZANO. Il saggio utilizza sali di tetrazolio di colore giallo solubili in acqua che vengono convertiti in formazano insolubile e di colore blu-violaceo, colore che deriva dallo sfaldamento riduttivo degli anelli di tetrazolio qualora le cellule abbiano un'attività metabolica. Se invece le cellule sono morte non presentano più attività metabolica e di conseguenza i sali non vengono convertiti e la sostanza rimane di colore giallo.

L'attività di riduzione del tetrazolio avviene principalmente nei mitocondri dove l'enzima succinato deidrogenasi è attivo solamente nelle cellule vive. L'attività metabolica è valutata attraverso la spettroscopia a determinate lunghezze d'onda [13]. L'assorbimento di luce delle cellule vive nel saggio MTT è maggiore rispetto alle cellule morte poiché queste trasformano i sali di tetrazolio in formazano il quale è un composto insolubile in acqua e perciò ostacola maggiormente il passaggio della luce; infatti secondo la legge di Lambert-Beer l'intensità luminosa di un raggio che colpisce una sostanza è data dalla formula:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-a(\lambda) \cdot c \cdot x}$$

Dove:

- I_0 è l'intensità luminosa del raggio incidente;
- $a(\lambda)$ è il coefficiente di assorbimento della sostanza che dipende dalla lunghezza d'onda utilizzata;
- c è la concentrazione della sostanza;
- x è la distanza percorsa attraverso il campione dal raggio incidente.

Da questa formula ricaviamo l'assorbanza che è definita come:

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = a(\lambda) \cdot c \cdot x$$

Posto che l'assorbanza dipende dalla concentrazione della soluzione in esame e che una sostanza solida è più concentrata di una liquida nel saggio MTT le cellule vive assorbono più luce di quelle morte [1]. I valori di assorbanza delle cellule vive sono superiori a 0,56 invece per le cellule morte sono inferiori a 0,12, cioè le cellule sono considerate vive se assorbono più del 43 % del raggio incidente invece sono considerate morte se assorbono meno del 22 % del raggio incidente [8].

L'assorbanza si misura con lo spettrofotometro. La spettroscopia sfrutta la proprietà che hanno gli atomi, legati tra loro con legami covalenti, di oscillare come due sfere legate da una molla. L'assorbimento di luce da parte di una molecola provoca un aumento dell'ampiezza della vibrazione tra gli atomi che le compongono: la molecola passa così dallo stato fondamentale a quello vibrazionale eccitato. La differenza di energia tra questi due stati determina la lunghezza d'onda d'assorbimento, la cui posizione nello spettro dipende da due fattori: la massa degli atomi legati e la relativa rigidità del legame. Così i tripli legami, più rigidi di quelli doppi, assorbono a frequenze più alte. Lo strumento tradizionale per ottenere uno spettro è lo spettrofotometro nel quale la luce della sorgente viene divisa in due raggi: il raggio di riferimento e quello che passa attraverso il campione; tale strumento utilizza inoltre un monocromatore che scompone la luce policromatica della sorgente nelle diverse lunghezze d'onda (luce monocromatica). Un rivelatore, infine, misura la differenza d'intensità dei due raggi ad ogni lunghezza d'onda [1].

4.2 - TEST DELLA COMETA

Il test della cometa, noto anche come elettroforesi su singola cellula, è un test di mutagenesi per l'identificazione di danni causati al DNA di una cellula da parte di un composto o dispositivo medico in esame. I danni possibili possono essere rotture del singolo filamento di DNA oppure del doppio filamento. Il test non permette di determinare l'entità del danno o la parte di genoma che l'ha subito una volta sottoposto all'agente citotossico. Le cellule da testare vengono poste su vetrino con diversi strati sovrapposti di agarosio (un polisaccaride) a diverse concentrazioni e successivamente vengono trattate con agenti in grado di rompere la membrana cellulare. Il vetrino con le cellule lisate viene coperto da un altro vetrino e posto in una vasca per elettroforesi. Al termine del processo viene aggiunta una sostanza fluorescente che si lega al DNA in modo da rendere visibile il nucleo al microscopio a fluorescenza. Se il nucleo non presenta danni appare rotondo ed omogeneo se invece è danneggiato i frammenti di DNA migrano verso l'anodo formando in questa direzione una struttura allungata e disomogenea come la coda di una cometa [13].

4.3 - TEST SUL CICLO DI VITA CELLULARE/TEST IN VITRO

Il test sul ciclo di vita delle cellule consiste nel valutare variazioni dei tempi delle fasi del ciclo cellulare. Di solito le variazioni si hanno nelle fasi G1 e G2 del ciclo cellulare.

Il test di citotossicità consiste nell'osservare gli effetti che il composto o l'estratto del composto provoca alle cellule di mammifero coltivate in vitro su mezzo nutriente. Il metodo che utilizza l'estratto viene chiamato METODO DI ELUIZIONE ed utilizza come mezzo di estrazione delle sostanze tossiche del composto le stesse soluzioni fisiologiche usate nella coltura cellulare che sono il grado di far rilasciare al campione un ampio raggio di composti chimici. Gli estratti così ottenuti vengono utilizzati come nuovo nutriente delle colture cellulari. I monostrati cellulari vengono osservati al microscopio per scoprire l'insorgere nel tempo di eventuali segnali di un'azione tossica, come per esempio: modifica della durata delle fasi G1 e/o G2, vitalità delle cellule, tasso di mortalità, ecc. Nel metodo di contatto diretto con il composto si procede alla stessa maniera solo che invece di utilizzare l'estratto si usa direttamente la sostanza in esame.

In questi tipi di test alle soluzioni fisiologiche delle cellule in coltura possono essere aggiunti, prima di procedere con il test, antibiotici per eliminare la possibile interferenza di microrganismi [1].

4.4 - TUNEL TEST

Il tunel test consiste nell'aggiunta di un nucleotide marcato sull'estremità 3'OH del DNA a livello di una rottura della doppia elica. Il nucleotide di solito ha legata una sostanza fluorescente per essere visibile al microscopio a fluorescenza [13].

4.5 - TEST IN VIVO

I test in vivo sono test fatti su modello animale; ne esistono di diverso tipo, i principali sono: TEST DI SENSIBILIZZAZIONE e TEST DI IRRITAZIONE. Nel primo viene osservato su cavie l'insorgere di reazioni di sensibilizzazione, o ipersensibilità, come conseguenza dell'azione ripetuta o prolungata delle sostanze rilasciate capaci di interagire con il sistema immunitario; nel secondo test degli estratti fluidi salini o in olio vegetale o direttamente il materiale in esame vengono applicati a livello intracutaneo della pelle primaria oppure oculare e si va ad osservare l'eventuale insorgere dei sintomi di arrossamento e/o gonfiore nelle zone interessate dalle iniezioni. Nel caso di iniezione o impianto, a seconda che venga analizzata la tossicità di un composto o di un dispositivo medico, viene valutata anche la perdita di peso della cavia in quanto il dimagrimento dell'animale è un sintomo di tossicità della sostanza [1].

4.6 – TEST LDH

Il saggio LDH o test di citotossicità-fluorescenza è un test di citotossicità che sfrutta una reazione che normalmente avviene all'interno delle cellule. L'enzima LATTATO DEIDROGENASI (LDH) è un enzima normalmente presente nel citoplasma delle cellule che catalizzano la reazione di trasformazione del lattato in piruvato. La reazione appena descritta è rappresentata in Figura 7.

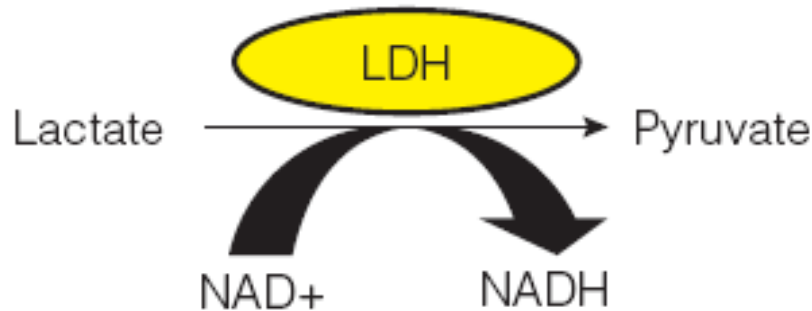


Figura 7: Reazione di trasformazione del lattato in piruvato [13]

In seguito ad un danno alla parete cellulare l'enzima LDH dal citoplasma si riversa nel mezzo di coltura. Il test di citotossicità accoppia alla reazione dell'enzima LDH una reazione contraria dove il substrato è un composto profluorescente (la RESAZURINA) che viene trasformata dall'enzima DIAFORASI in un composto fluorescente (la RESORUFINA) che emette alla lunghezza d'onda di 590 nm. La reazione appena descritta è rappresentata in Figura 8.

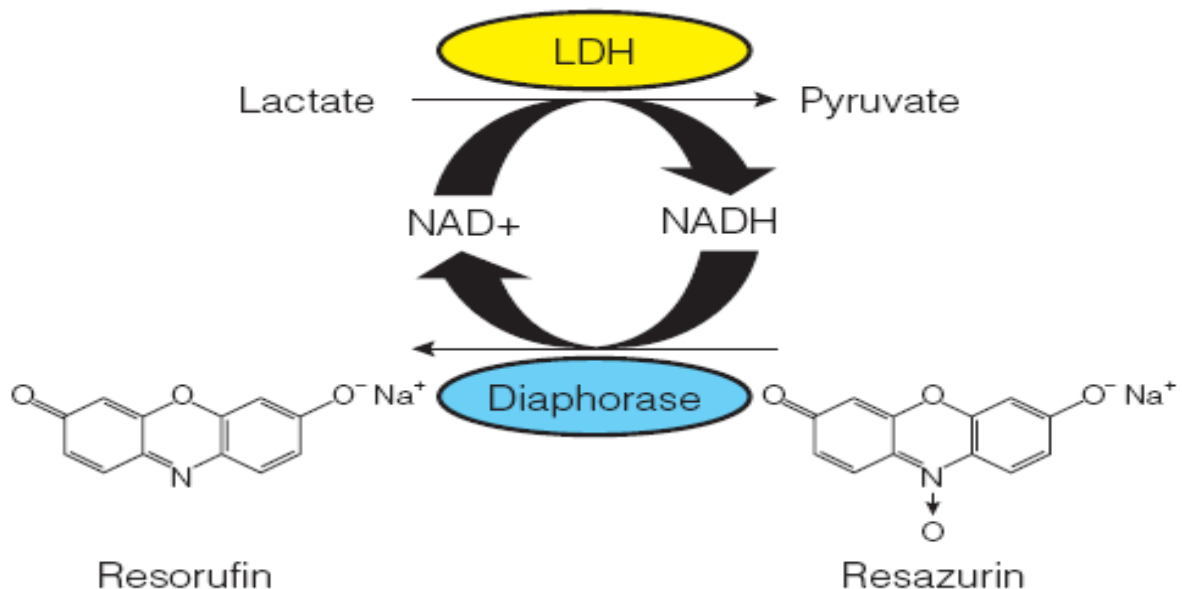


Figura 8: Reazione di trasformazione della resazurina in resorufina [13]

La reazione contraria citata avviene solo se le cellule analizzate sono lesionate poiché solo in questo caso l'LDH è riversato nel substrato [13].

4.7 – TEST CON IL BLU TRIPANO

Il saggio con il blu tripano è un saggio colorimetrico. Il blu tripano è un colorante utilizzato per determinare la vitalità cellulare, infatti permette di discriminare le cellule vive da quelle morte in quanto il colorante viene assorbito solo dalle cellule morte [13].

5 - INTERAZIONE DELLE NANOPARTICELLE CON IL SISTEMA IMMUNITARIO.

Importante è analizzare gli effetti che le nanoparticelle hanno in vivo, in quanto appena queste entrano in contatto con l'ambiente biologico subiscono delle variazioni, infatti le cellule immunitarie nel flusso sanguigno (come monociti, piastrine, leucociti e cellule dendritiche) e nei tessuti hanno la propensione a fagocitare le nanoparticelle. Il legame delle MNP con le proteine avviene quasi istantaneamente una volta che le particelle entrano nel mezzo biologico e le proprietà fisico-chimiche del complesso particella-proteina sono spesso diverse rispetto a quelle delle particelle iniziali [5].

Queste nuove proprietà possono portare a risposte biologiche differenti e cambiare la biodistribuzione delle particelle stesse. L'assorbimento da parte delle cellule immunitarie può avvenire in modi diversi e può essere facilitato dall'adsorbimento di OPSONINE⁴ sulla superficie delle nanoparticelle. L'adsorbimento di opsonine può causare la migrazione delle nanoparticelle lontano dal sito d'applicazione previsto.

Importante valutare l'emocompatibilità delle particelle e per farlo vengono analizzate tre cose:

- EMOLISI;
- TROMBOGENICITÀ;
- ATTIVAZIONE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

Oltre all'emocompatibilità vengono valutate altre due cose:

- INTERAZIONE CON LE PROTEINE PLASMATICHE;
- ASSORBIMENTO DI MNP DA PARTE DEI MACROFAGI [5].

5.1 - EMOLISI

L'emolisi è il termine comunemente usato per descrivere i danni ai globuli rossi che portano alla fuoriuscita del ferro contenuto dall'emoglobina, condizione pericolosa per la vita in quanto può portare ad alcune malattie come l'anemia [5].

Poiché gli eritrociti occupano un volume di sangue maggiore rispetto alle altre cellule le nanoparticelle iniettate per via endovenosa entrano in contatto prima con le cellule rosse del sangue e poi con le cellule immunitarie[5].

Per le nanoparticelle non rivestite si è notato che le proprietà di superficie, specialmente la carica, possono causare l'emolisi, per esempio quelle con carica superficiale negativa non hanno tendenza emolitica, ma quest'ultima aumenta proporzionalmente al numero dei gruppi superficiali cationici. La presenza di ammine primarie non protette crea un danno dose-dipendente dalla quantità di nanoparticelle iniettate. Se le ammine invece vengono bloccate, per esempio tramite un rivestimento, si ottiene la riduzione dell'emotossicità. La combinazione di siti

⁴ Opsonine = macromolecole che se si legano ad un microorganismo o ad un qualsiasi agente esterno all'ambiente biologico facilitano la fagocitosi in quanto queste molecole vengono riconosciute dai recettori dei fagociti.

idrofobici e idrofilici sulla superficie delle particelle le portano ad agire come tensioattivi e causano la rottura della membrana eritrocitica. Infine l'aggiunta di un polimero sulla superficie porta ad una riduzione dell'attività emolitica [5].

5.2 - TROMBOGENICITÀ

La trombogenicità è la propensione di un materiale ad indurre coagulazione del sangue ed occlusione parziale o totale di un vaso con un trombo (aggregato di globuli rossi, piastrine, fibrina ed elementi cellulari). Il contatto delle nanoparticelle con i componenti della coagulazione può portare all'attivazione della cascata emocoagulativa e all'aggregazione piastrinica. La riduzione della carica superficiale delle particelle con un rivestimento polimerico riduce l'aggregazione piastrinica, la quale per essere indotta ha bisogno dell'attivazione del recettore della glicoproteina integrina. L'attivazione di quest'ultima dipende dalle dimensioni delle particelle, infatti quelle dell'ordine dei micron richiedono la proteina C-Chinasi, invece per quelle dell'ordine dei nanometri l'attivazione è indipendente dalla Chinasi. Inoltre si è notato che le nanoparticelle portano alla coagulazione con reazioni diverse rispetto a quelle tradizionali e per questi motivi le normali terapie anticoagulanti possono non avere effetto; infatti mentre tradizionalmente la cascata emocoagulativa richiede l'adenosina difosfato (ADP) e il trombossano A₂⁵ quando il sangue entra in contatto con le nanoparticelle la coagulazione è indipendente da questi fattori [5].

5.3 - ATTIVAZIONE SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Il sistema del complemento è un gruppo di proteine collegate tra loro in cascata biochimica che rimuove patogeni dall'organismo e contribuisce ad alterare la biodistribuzione delle nanoparticelle. Questo sistema serve per “integrare” l'immunità cellulo-mediata e la sua attivazione è causa di ipersensibilità e anafilassi (grave reazione allergica che può portare alla morte) [5].

Poiché l'attivazione del sistema del complemento è superficie-dipendente la carica superficiale delle nanoparticelle è un fattore importante da valutare; infatti particelle cariche in superficie sono attivatori efficienti di questo sistema rispetto alle loro controparti neutre. I rivestimenti polimerici che si comportano come tensioattivi non ionici, come il PEG, riducono l'attivazione del complemento che invece aumenta con rivestimenti in destrano (polimero naturale) e proporzionalmente allo spessore del rivestimento [5].

5.4 – INTERAZIONE CON LE PROTEINE PLASMATICHE

Le proteine del sangue che si legano alle nanoparticelle sono diverse (immunoglobuline, componenti del sistema del complemento, fibrinogeno ed

⁵ Trombossano A₂ = composto chimico presente nelle piastrine che permette la vasocostrizione e favorisce l'aggregazione piastrinica.

albumina) però la composizione completa della proteina di rivestimento in qualsiasi momento è funzione della concentrazione di tutte le proteine plasmatiche e della loro cinetica di legame; perciò il complesso proteina-nanoparticella è un flusso continuo per tutta la durata della sua interazione con l'ambiente biologico è per questo motivo il suo comportamento varia continuamente [5].

L'adsorbimento di proteine plasmatiche sulla superficie delle nanoparticelle, conosciuto come opsonizzazione, avviene non appena le particelle entrano nel flusso sanguigno. Alcune opsonine hanno grande affinità di legame con le nanoparticelle e le caratteristiche fisiche del complesso proteina-nanoparticella risultante sono diverse da quelle della nanoparticella iniziale perciò è importante valutare queste differenze per calcolare la distribuzione e le risposte biologiche che si verificano [5].

Il legame con la proteina plasmatica può aumentare la dimensione della particella e la sua carica superficiale effettiva influenzando così l'assorbimento da parte dei macrofagi.

L'opsonizzazione inoltre dipende dalla carica superficiale delle nanoparticelle e delle loro dimensioni. Infatti nanoparticelle con carica superficiale positiva o negativa attraggono maggiormente le proteine plasmatiche ed inoltre le proteine del sangue si legano più facilmente all'aumentare delle dimensioni delle nanoparticelle.

Per ridurre l'opsonizzazione è possibile rivestire le nanoparticelle con glicole polietilenico [5].

5.5 – ASSORBIMENTO DI MNP DA PARTE DEI MACROFAGI

Proprietà fisico-chimiche delle nanoparticelle come la dimensione, la carica superficiale, la solubilità e la funzionalizzazione della superficie influenzano l'assorbimento di nanoparticelle da parte dei macrofagi [5].

In generale particelle con uguale composizione e proprietà superficiali vengono assorbite diversamente a seconda della dimensione, particelle più grandi vengono interiorizzate dai macrofagi più efficientemente di quelle più piccole. Inoltre è stato dimostrato che nanoparticelle con uguale dimensione vengono fagocitate più o meno efficacemente a seconda della carica superficiale, infatti particelle aventi carica positiva o negativa vengono assorbite maggiormente dai fagociti rispetto a quelle di carica neutra. La manipolazione della dimensione e della carica di nanoparticelle è utile per limitare l'opsonizzazione e l'assorbimento da parte dei fagociti evitando così il trasporto di nanoparticelle lontano dal sito d'applicazione desiderato [5].

Alcuni studi hanno dimostrato che nanoparticelle rivestite con chitosano e mannosio (un monossaccaride) vengono assorbite molto efficacemente da macrofagi e cellule dendritiche⁶; invece nanoparticelle rivestite con PEG non vengono riconosciute dal sistema immunitario. L'aggiunta di glicole polietilenico aumenta la permanenza di nanoparticelle nel flusso sanguigno perché il PEG crea uno scudo sterico intorno alla

⁶ Cellule dendritiche = sono cellule specializzate nella cattura di antigeni però, a differenza dei macrofagi, esse non sono in grado di fagocitare l'antigene ma lo espongono sulla superficie in seguito all'interazione con esso in modo che possa essere riconosciuto maggiormente dalle cellule immunitarie

nanoparticella rivestita prevenendo l'adesione di proteine plasmatiche e di conseguenza l'assorbimento delle nanoparticelle da parte dei macrofagi [5].

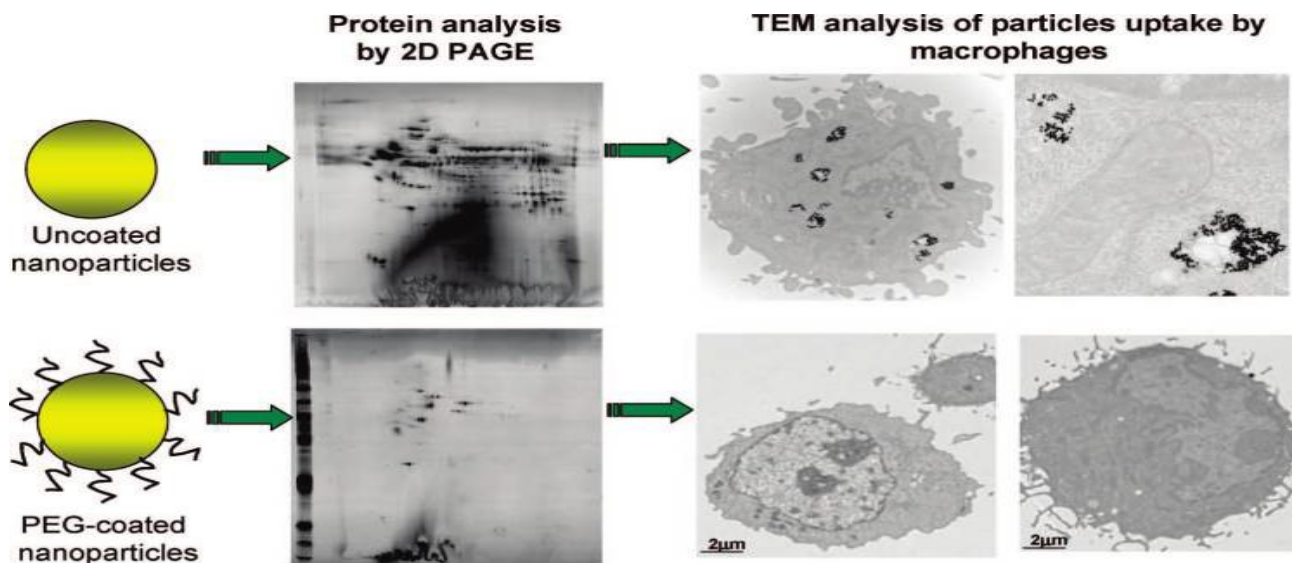


Figura 9: Assorbimento di nanoparticelle ricoperte con PEG e non ricoperte da parte dei macrofagi [5]

In Tabella 1 sono elencati i diversi danni che le nanoparticelle producono, le diverse cause e le rispettive soluzioni.

DANNO	CAUSA	SOLUZIONE
Emolisi	Carica superficiale	Rivestimento con un polimero organico
	Ammine primarie in superficie	
	Siti idrofilici ed idrofobici in superficie	
Trombogenicità	Carica superficiale	Rivestimento con un polimero organico
	Dimensione nanoparticelle	
Attivazione sistema del complemento	Carica superficiale	Rivestimento con un polimero organico
	Dimensione nanoparticelle	
Interazione proteine plasmatiche	Carica superficiale	Rivestimento con PEG
	Dimensione nanoparticelle	
Assorbimento da parte dei macrofagi	Carica superficiale	Rivestimento in PEG
	Dimensione nanoparticelle	
	Rivestimenti in chitosano o mannosio	

Tabella 1: Danni che vengono prodotti dalle nanoparticelle, cause e soluzioni.

5.6 – SAGGI PER STUDIARE L'INTERAZIONE DELLE NANOPARTICELLE CON IL SISTEMA IMMUNITARIO

Le proprietà tossiche delle nanoparticelle vengono caratterizzate da test *in vitro* ed *in vivo*.

Le nanoparticelle vengono sottoposte ad una batteria di test immunologici *in vitro* per eliminare i “candidati” potenzialmente pericolosi e per capire maggiormente le proprietà chimico-fisiche che possono essere regolate per limitare l'immunotossicità. I test *in vitro* più comunemente usati per valutare l'emocompatibilità sono il test di emolisi, il test che valuta l'attivazione del sistema del complemento e il test che valuta la trombogenicità. Per valutare l'assorbimento da parte dei macrofagi e dagli organi del sistema reticoloendoteliale (RES)⁷ ci sono i test di chemiotassi e fagocitosi. Questi ed altri metodi sono riassunti in Tabella 2 e possono essere utilizzati per comprendere le proprietà delle nanoparticelle destinate alla somministrazione sistemica [5].

⁷ Sistema reticoloendoteliale (RES) = è un sistema funzionale dell'organismo, privo di una propria sede anatomica che lo contraddistingue, che fa parte del sistema immunitario. Il compito del RES è di eliminare sostanze estranee all'organismo che potrebbero essere dannose.

Saggi per l'analisi degli effetti tossici delle nanoparticelle	Descrizione
Test di emolisi	Test per valutare la capacità delle nanoparticelle di danneggiare le cellule rosse del sangue
Test di aggregazione piastrinica	Test per valutare le proprietà anticoagulanti o meno delle nanoparticelle
Test di coagulazione	Usato come supporto del test di aggregazione piastrinica
Test di attivazione del sistema del complemento	Test per valutare se le nanoparticelle attivano o meno il sistema del complemento
Test di fagocitosi	Test di assorbimento parziale delle particelle da parte dei macrofagi
CFU-GM	Test che calcola gli effetti che le nanoparticelle causano alle cellule del midollo osseo
Test del burst ossidativo ⁸	Test per valutare l'induzione del burst ossidativo dei macrofagi
Test di chemiotassi	Test che valuta la capacità delle particelle di attrarre i macrofagi

Tabella 2: Test in vitro per valutare la compatibilità delle nanoparticelle con il sistema immunitario

I test in vitro appena citati permettono di scremare alcuni campioni di nanoparticelle prevedendo i possibili risultati in vivo, cioè permettono di valutare quali dei campioni di nanoparticelle sotto analisi sono tossici e perciò non possono essere utilizzati nella sperimentazione in vivo.

I test in vivo consistono nell'iniettare per via endovenosa i campioni di nanoparticelle, che sono stati “promossi nei test in vitro”, in cavie animali. Successivamente vengono valutati sulle cavie l'insorgere di trombi, reazioni di ipersensibilità alle nanoparticelle, perdita di peso e se le nanoparticelle sono arrivate nel sito d'applicazione desiderato [5].

⁸ Burst ossidativo = è la produzione massiva ed il successivo rilascio di specie reattive dell'ossigeno da parte di alcune cellule. Nel caso dei macrofagi indica il rilascio di tali radicali, nel corso di un'inflammatione, per uccidere microbi e patogeni.

- SAGGIO DI EMOLISI

Il saggio di emolisi viene eseguito su eritrociti umani sani diluiti con il 2% di tampone PBS, composto da: 150 mM di cloruro di sodio (NaCl) e 10 mM di fosfato. La soluzione ottenuta ha pH 7,4. La capacità delle nanoparticelle di lesionare i globuli rossi viene valutata mescolando gli eritrociti diluiti con le nanoparticelle in esame e dopo 30 minuti di contatto viene valutato il quantitativo di emoglobina rilasciata dalla rottura degli eritrociti. La quantità di emoglobina viene valutata con lo spettrofotometro a 413 nm perché l'emoglobina libera assorbe maggiormente a 413 nm rispetto all'emoglobina che si trova all'interno dei globuli rossi. La percentuale di eritrociti lesionati si calcola grazie all'assorbanza definita come:

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = a(\lambda) \cdot c \cdot x$$

Dove:

- I_0 è l'intensità luminosa del raggio incidente;
- I è l'intensità luminosa del raggio che esce dal campione in esame;
- $a(\lambda)$ è il coefficiente di assorbimento della sostanza che dipende dalla lunghezza d'onda utilizzata;
- c è la concentrazione della sostanza;
- x è la distanza percorsa dal raggio incidente attraverso il campione in esame.

Per calcolare la percentuale di eritrociti lesionati si determina l'assorbanza dei globuli rossi sani (A_s), poi l'assorbanza degli eritrociti posti a contatto con le nanoparticelle (A_n) e si calcola la percentuale di globuli rossi lisi (P) con la seguente formula [13]:

$$P(\%) = \left(\frac{A_n}{A_s} - 1 \right) \cdot 100 \%$$

- SAGGIO DI AGGREGAZIONE PIASTRINICA

Il saggio di aggregazione piastrinica valuta la capacità delle piastrine di aderire l'una all'altra.

In caso di danno alle pareti di un vaso ci sono diversi fattori che partecipano alla formazione del tappo piastrinico: un numero adeguato di piastrine, trombina e fibrinogeno.

Per quest'analisi le piastrine vengono fatte aggregare in presenza di agonisti piastrinici⁹ come: adenosina difosfato (ADP), collagene e trombina. In seguito alla formazione degli aggregati viene valutata la luce che filtra attraverso il campione questo perché l'aggregazione piastrinica aumenta la luce che filtra attraverso il plasma. Il test viene eseguito su cellule che sono entrate in contatto con

⁹ Agonisti piastrinici = sono sostanze rilasciate nel circolo sanguigno che si legano a dei recettori sulle piastrine che ne trasducono il segnale favorendone l'aggregazione.

nanoparticelle e su cellule non trattate e si valuta la diversa percentuale di aggregazione piastrinica con il test appena descritto [13].

- SAGGIO DEI FATTORI DI COAGULAZIONE

Il saggio dei fattori di coagulazione, o tempo di protrombina, viene utilizzato per determinare la tendenza alla coagulazione del sangue. Il sangue, al quale è stato aggiunto un anticoagulante, viene centrifugato in modo da separare il plasma dalle cellule del sangue; dopo di che al plasma viene aggiunto un eccesso di calcio per eliminare l'effetto dell'anticoagulante e questo consente al plasma di coagulare e di calcolare il tempo che quest'ultimo impiega per addensarsi. Nel caso di sangue entrato in contatto con nanoparticelle è importante valutare l'attività percentuale del tempo di protrombina; cioè viene calcolato quanto varia in percentuale il tempo di coagulazione delle cellule ematiche trattate rispetto a quelle che non sono entrate in contatto con nanoparticelle con la seguente formula [13]:

$$P = \frac{T_n}{T_c}$$

Dove:

- *P indica la percentuale;*
- *T_n il tempo di coagulazione di cellule ematiche poste a contatto con nanoparticelle;*
- *T_c il tempo di coagulazione di cellule ematiche che non sono entrate in contatto con nanoparticelle.*

- SAGGIO DI ATTIVAZIONE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Questo saggio valuta se il sistema del complemento è stato attivato valutando la percentuale di vitalità cellulare; infatti l'attivazione del sistema del complemento porta alla lisi cellulare. Per valutare se il sistema del complemento è stato attivato o meno si utilizza la stessa reazione che si utilizza nel saggio LDH (v. cap. 4 par. 4.6) [13].

- TEST DI FAGOCITOSI

Il test di fagocitosi permette di valutare quante nanoparticelle sono state interiorizzate dai macrofagi attraverso la citofluorimetria a flusso. In questa tecnica le cellule di interesse, in questo caso i leucociti, vengono fatte passare attraverso un capillare molto sottile in modo tale che le cellule proseguano lungo il capillare in “fila indiana”; poi le cellule vengono colpite da un raggio laser ad una determinata lunghezza d'onda e poi viene valutata l'assorbanza del campione. Il numero di nanoparticelle che si trovano all'interno dei macrofagi (N) viene calcolata con la seguente formula [13]:

$$N = \frac{t}{s} \cdot N_0$$

Dove:

- *t è l'assorbanza dei macrofagi in esame;*
- *s è l'assorbanza dei macrofagi che hanno le nanoparticelle al loro interno;*
- *N₀ è il numero di nanoparticelle iniettato.*

- TEST CFU-GM

CFU-GM¹⁰ è l'acronimo per indicare le unità che formano le colonie di macrofagi-granulociti¹¹. Questo test valuta l'aumento o la diminuzione di granulociti nel campione posto a contatto con nanoparticelle rispetto al campione ematico non sottoposto alla presenza di particelle magnetiche. Per valutare questo fattore viene utilizzato un microscopio elettronico ed i granulociti vengono resi visibili con una sostanza fluorescente [13].

- TEST DEL BURST OSSIDATIVO

Le cellule poste a contatto con nanoparticelle possono attivarsi e così le cellule rilasciano specie reattive dell' O₂ (ROS). I ROS sono molecole o porzioni di molecole che possiedono un elettrone spaiato che le rende molto reattive e questo le porta a lesionare le cellule adiacenti. I ROS diminuiscono l'assorbanza del campione perciò grazie a quest'ultima è possibile valutare la vitalità cellulare con la seguente formula [13]:

$$v(\%) = \frac{t}{k} \cdot 100 \%$$

Dove:

- *v è la percentuale di sopravvivenza cellulare;*
- *t è l'assorbanza a 450 nm delle cellule poste a contatto con le nanoparticelle;*
- *k è l'assorbanza a 450 nm di cellule non esposte a nanoparticelle.*

- TEST DI CHEMIOTASSI

Il test di chemiotassi permette di valutare la capacità di un campione cellulare di rispondere ad uno stimolo chemiotattico¹². Il test utilizza due compartimenti separati da una membrana porosa, da una parte si trovano le nanoparticelle e dall'altra

10 CFU-GM = Colony Forming Unit – Granulocyte Macrophage

11 Granulociti = tipo di globuli bianchi

12 Stimolo o fattore chemiotattico = sono sostanze che causano la migrazione direzionale delle cellule.

i macrofagi (in opportune soluzioni). La porosità della membrana viene scelta in base alla grandezza delle cellule infatti deve essere abbastanza piccola da impedire il passaggio passivo delle cellule ma abbastanza grande da permettere il passaggio attivo. Il test valuta se c'è migrazione di macrofagi verso le nanoparticelle e nel caso ne valuta la percentuale che si è spostata; i macrofagi vengono marcati con un composto radioattivo e poi viene valutata l'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda che permette di calcolare la percentuale di macrofagi che sono migrati [13].

6 – CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE IN ALCUNI CASI PARTICOLARI

In Tabella 3 sono riassunti gli studi analizzati nei prossimi paragrafi.

Studio	Tipo di cellule	Tipo di NP	Tipo di ricoprimento	Dimensione nucleo (Ø)	Test di citotossicità
Primo	Cellule di adenocarcinoma mammario	Rivestite	Componenti organici+ tensioattivi a carica negativa	Ø = 8 nm Ø _{riv} = 10 nm	Saggio MTT
			Componenti organici+ tensioattivi a carica positiva	Ø = 8 nm Ø _{riv} = 10 nm	
			Derivato dell'amido+ tensioattivi a carica positiva	Ø = 8 nm Ø _{riv} = 220 nm	
		Non rivestite	Nessuno	Ø = 8 nm	
Secondo	Cellule endoteliali aortiche umane	Rivestite	DMSA	Ø = 8 nm Ø _{riv} = 10 nm	Saggio MTT
Terzo	Cellule di adenocarcinoma polmonare	Rivestite	SO ¹³	Ø = 7,6 nm Ø _{riv} = 44 nm	Saggio MTT
	Fibroblasti polmonari		SO+PEG ¹⁴	Ø = 7,6 nm Ø _{riv} = 76 nm	
			SO+PEG+P LGA ¹⁵	Ø = 7,6 nm Ø _{riv} = 155 nm	

Tabella 3: Sintesi degli studi analizzati.

¹³ SO = acronimo per oleato di sodio

¹⁴ PEG = acronimo per glicole polietilenico

¹⁵ PLGA = acronimo per acido poli(lattico-co-glicolico)

6.1- CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE PER CELLULE DI ADENOCARCINOMA MAMMARIO [8]

Lo studio in vitro per la valutazione della citotossicità di nanoparticelle rivestite è stato condotto dall'università di Jena, in Germania su cellule di adenocarcinoma mammario.

– CAMPIONI DI NANOPARTICELLE UTILIZZATI

Lo studio utilizza quattro diversi fluidi di nanoparticelle sospese in acqua. Ciascuna sospensione differisce dalle altre per dimensione delle particelle e/o per il tipo di rivestimento che le nanoparticelle presentano. I quattro tipi di campioni utilizzati sono elencati in Tabella 4.

Campione n°	Dimensione particella (nucleo + rivestimento)	Rivestimento
1	10 nm nucleo $\varnothing = 8$ nm	Componenti organici con tensioattivi a carica negativa
2	10 nm nucleo $\varnothing = 8$ nm	Componenti organici con tensioattivi a carica positiva
3	220 nm nucleo $\varnothing = 8$ nm	Derivato dell'amido con tensioattivi a carica positiva
4	8 nm	Nessuno

Tabella 4: Tipi di campioni utilizzati

Il campione numero 4 è utilizzato come campione di riferimento in quanto le nanoparticelle non presentano rivestimento [8].

– CELLULE UTILIZZATE

Le cellule utilizzate per l'esperimento sono una linea di cellule di adenocarcinoma mammario (BT-20) coltivate con crescita esponenziale in monostrato. Le cellule sono state coltivate in MEM (Minimum Essential Medium) con l'aggiunta del 10 % di siero di bovino fetale [8].

– METODO UTILIZZATO PER VALUTARE LA VITALITÀ CELLULARE

Dopo 24 ore di coltura alle cellule, seminate in 96 capsule petri, è stato

sostituito il mezzo nutriente. Al suo posto è stata messa una delle sospensioni di nanoparticelle. In particolare sono state usate tre diverse concentrazioni di nanoparticelle: 0.2, 2 e 20 ng/cell. Dopo 24, 48 e 72 ore è stata valutata la citotossicità [8].

La vitalità delle cellule dopo l'esposizione alle nanoparticelle viene valutata con il saggio MTT, dove la citotossicità viene calcolata con la seguente formula [8]:

$$v(\%) = \frac{t}{k} \cdot 100\%$$

Dove:

- v è la percentuale di sopravvivenza cellulare;
- t è l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm delle cellule poste a contatto con le nanoparticelle;
- k è l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm di cellule non esposte a nanoparticelle.

– RISULTATI

In Tabella 5 sono elencati i risultati ottenuti dall'esperimento:

Campione / Concentrazione di magnetite (ng/cell)	Sopravvivenza cellulare dopo il periodo di incubazione (in ore)		
	24 h	48 h	72 h
Campione 1			
0,2 ng/cell	92 ± 6	85 ± 3	85 ± 7
2 ng/cell	96 ± 4	85 ± 7	88 ± 8
20 ng/cell	89 ± 4	79 ± 4	79 ± 7
Campione 2			
0,2 ng/cell	97 ± 5	84 ± 8	88 ± 5
2 ng/cell	3 ± 5	3 ± 2	0 ± 0
20 ng/cell	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Campione 3			
0,2 ng/cell	105 ± 5	99 ± 11	91 ± 4
2 ng/cell	93 ± 4	90 ± 8	76 ± 4
20 ng/cell	69 ± 6	59 ± 5	36 ± 2
Campione 4			
0,2 ng/cell	99 ± 4	103 ± 7	97 ± 5
2 ng/cell	92 ± 5	95 ± 7	98 ± 6
20 ng/cell	92 ± 5	91 ± 4	82 ± 7

Tabella 5: Risultati dell'esperimento

Risultati al variare della concentrazione di NP dopo 24 h

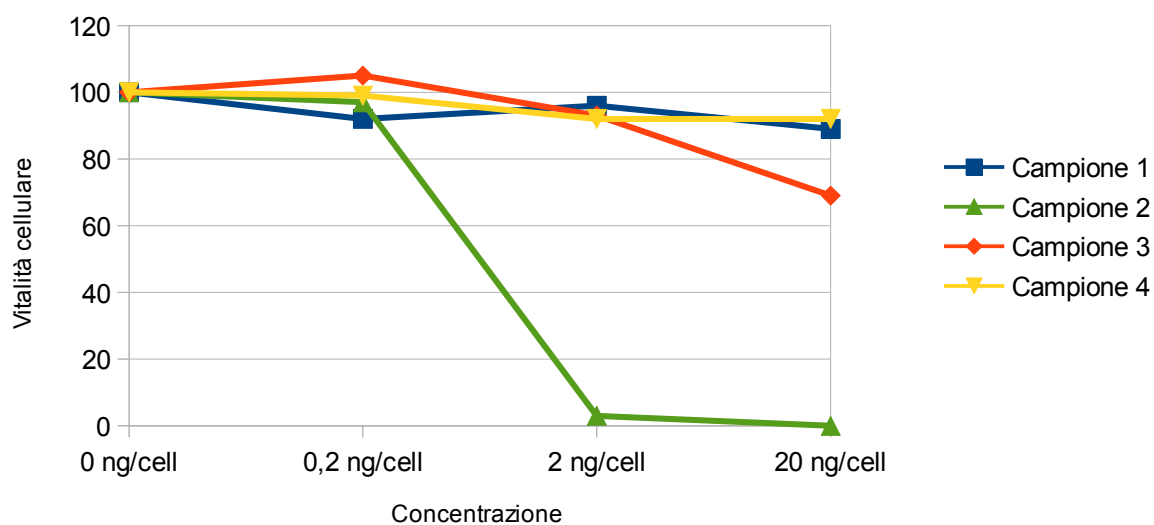


Figura 10: Vitalità cellulare al variare della concentrazione di nanoparticelle dopo 24 h.

Risultati al variare della concentrazione di NP dopo 48 h

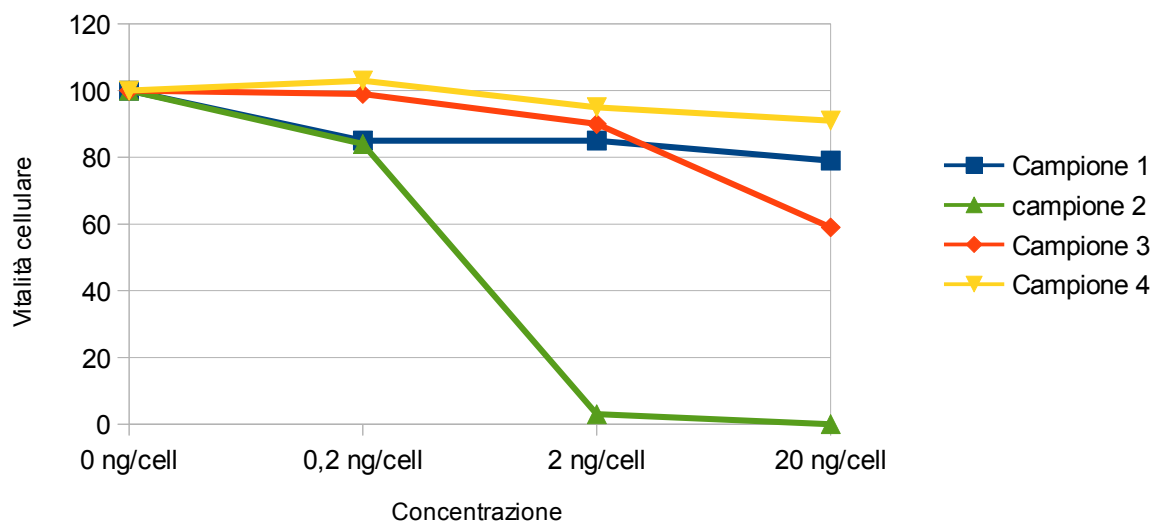


Figura 11: Vitalità cellulare al variare della concentrazione di nanoparticelle dopo 48 h.

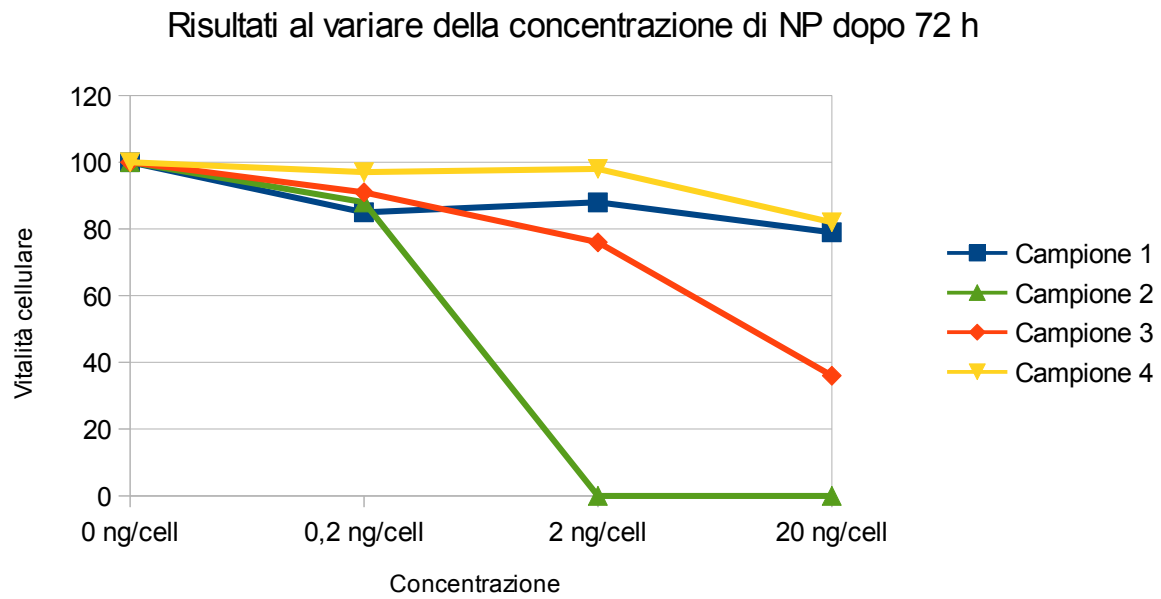


Figura 12: Vitalità cellulare al variare della concentrazione di nanoparticelle dopo 72 h.

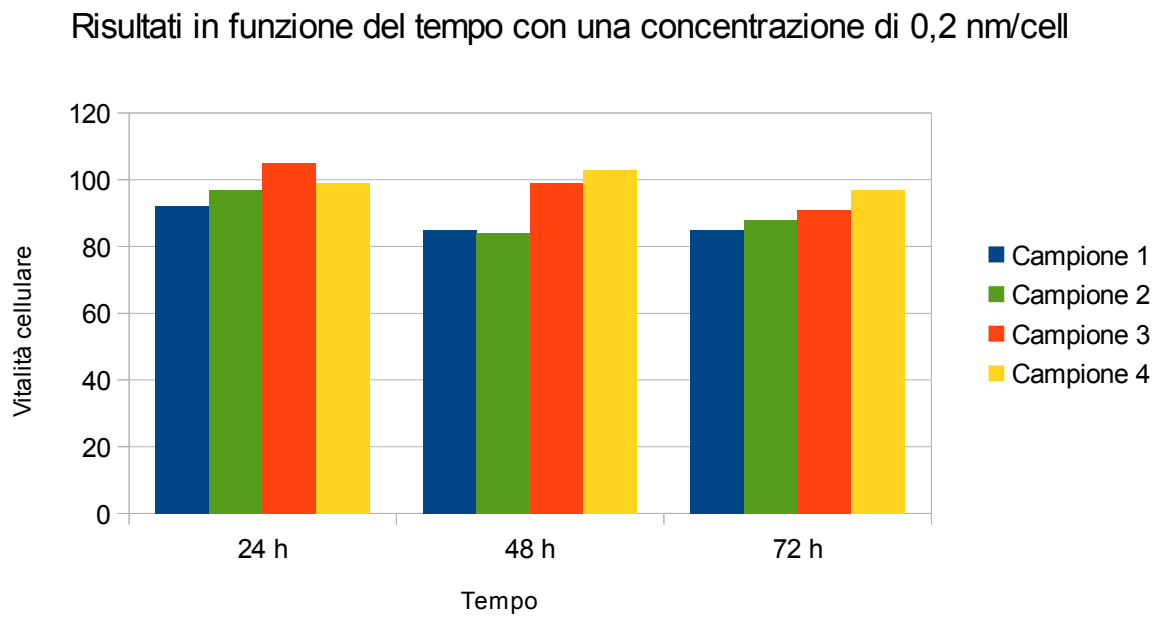


Figura 13: Vitalità cellulare al variare del tempo con una concentazione di nanoparticelle di 0,2 ng/cell

Risultati in funzione del tempo con una concentrazione di 2 ng/cell

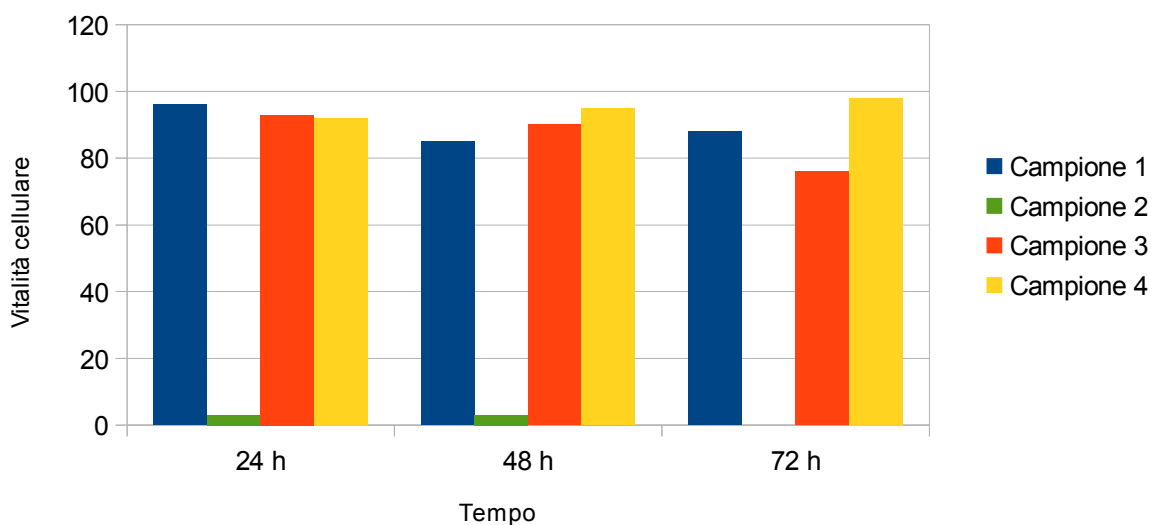


Figura 14: Vitalità cellulare al variare del tempo con una concentrazione di nanoparticelle di 2 ng/cell

Risultati in funzione del tempo con una concentrazione di 20 ng/cell

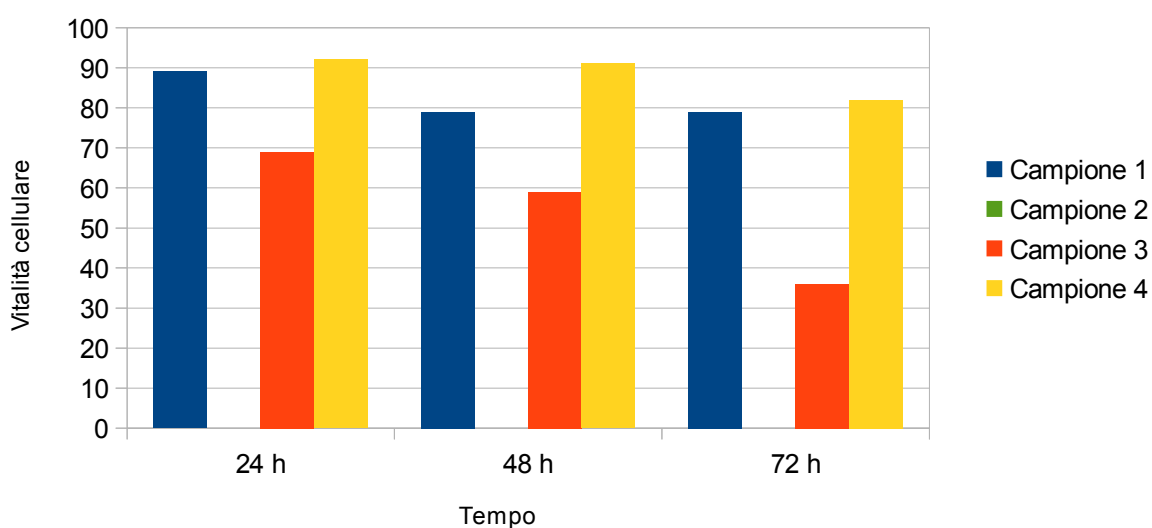


Figura 15: Vitalità cellulare al variare del tempo con una concentrazione di nanoparticelle di 20 ng/cell.

Questo studio valuta la citotossicità dei diversi campioni di nanoparticelle, ricoperte con:

- Componenti organici più tensioattivi a carica negativa e positiva
- Un derivato dell'amido più tensioattivi a carica positiva;
- Nessun tipo di rivestimento.

in funzione della concentrazione di nanoparticelle per cellula e del tempo di contatto [8].

Le cellule poste a contatto con il campione 1 di nanoparticelle presentano una distribuzione omogenea della CROMATINA nel nucleo delle cellule, una alterazione della struttura del reticolo endoplasmatico e dei mitocondri [8].

Le cellule poste in coltura con il campione 2 di nanoparticelle presentano alterazioni tipiche delle cellule morte; infatti hanno una distribuzione disomogenea della cromatina all'interno dei nuclei e la membrana cellulare presenta rotture [8].

I campioni cellulari posti a contatto con la terza sospensione di nanoparticelle presentano: mitocondri rigonfi, cromatina in parte omogenea e in parte distribuita a zolle e il reticolo endoplasmatico ben delimitato [8].

Infine il campione numero 4 di nanoparticelle non altera sensibilmente le cellule.

– CONCLUSIONI

Per tutti i campioni utilizzati la citotossicità della soluzione di nanoparticelle dipende dal tipo di rivestimento ed aumenta all'aumentare della percentuale di magnetite per cellula; infatti per tutti i campioni la percentuale di vitalità cellulare è accettabile se la concentrazione di magnetite è pari a 0,2 ng/cell, cioè la vitalità è superiore all'80 % [8].

I campioni maggiormente tossici risultano essere il numero 2 e 3. Questo effetto è dovuto alle cariche positive presenti sul rivestimento delle nanoparticelle che portano ad un legame elettrostatico con le cariche negative dei componenti della membrana cellulare portando alla distruzione della cellula stessa [8].

Il campione 1 invece avendo cariche negative in superficie presenta un minor effetto citotossico rispetto ai campioni 2 e 3 e la percentuale di vitalità è accettabile se la concentrazione di nanoparticelle è inferiore a 2 ng/cell e/o il tempo di contatto è minore a 24 ore, questo perché il campione 1 presenta cariche negative in superficie che portano comunque alla rottura della membrana cellulare e del DNA anche se meno rispetto alle cariche positive [8].

L'unico campione che fornisce una percentuale di tossicità accettabile in tutti i casi è il campione 4 (NP non ricoperte) per cui la citotossicità è data dallo strato di ricoprimento del nucleo.

Da quanto appena analizzato risulta che i campioni 1, 2 e 3 non possono essere utilizzati per il trattamento di adenocarcinoma in vivo poiché la citotossicità evidenziata potrebbe non essere limitata alle sole cellule tumorali poiché lo studio non è stato effettuato su cellule sane [8].

6.2 - CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE PER CELLULE ENDOTELIALI AORTICHE UMANE [9]

Lo studio in vitro per valutare la citotossicità delle nanoparticelle è stato condotto dai ricercatori dell'università di Nanchino, in Cina su cellule endoteliali

aortiche umane.

– CAMPIONI DI NANOPARTICELLE USATE

Questo studio utilizza nanoparticelle del diametro di 10 nm ricoperte da DMSA (acido meso-2,3-dimercaptosuccinico), un polimero organico sintetico. Le nanoparticelle sono diluite in acqua deionizzata alla concentrazione di 1 mg/ml e poi ulteriormente diluite col terreno di coltura a concentrazioni comprese tra gli 0,001 e gli 0,2 mg/ml [9].

– CELLULE UTILIZZATE

Le cellule utilizzate per l'esperimento sono cellule endoteliali aortiche umane (HAEC) coltivate in DMEM¹⁶ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con l'aggiunta di: l'1% di ECGS (supplemento di crescita di cellule endoteliali), il 20% di FBS (siero di bovino fetale) e l'1% di eparina sodica (anticoagulante). Le cellule inoltre vengono mantenute alla temperatura di 37 °C [9].

– METODO UTILIZZATO PER VALUTARE LA VITALITÀ CELLULARE

La citotossicità delle nanoparticelle per cellule endoteliali aortiche umane viene valutata con il saggio MTT.

Per valutare gli effetti citotossici dipendenti dalla dose le DMSA-Fe₂O₃ vengono diluite con il mezzo di coltura ad una concentrazione che varia da 0,001 a 0,2 mg/ml e lasciate a contatto con le cellule endoteliali per 24 ore [9].

Per calcolare la citotossicità in funzione del tempo di contatto le nanoparticelle vengono diluite con il terreno di coltura ad una concentrazione di 0,05 mg/ml e lasciate in coltura con le cellule per 4, 24, 48 e 72 ore [9].

Poi le cellule, dopo essere state lavate con PBS, vengono poste in soluzione con sali di tetrazolio, tipici del saggio MTT, per 2 ore a 37 °C. Infine viene valutata la vitalità cellulare con la formula:

$$v(\%) = \frac{t}{k} \cdot 100\%$$

Dove:

- $v(\%)$ è la percentuale di vitalità cellulare;
- t è l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm delle cellule poste a contatto con le DMSA-Fe₂O₃;
- k è l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm di cellule non trattate.

¹⁶ DMEM = è un tipo di terreno di coltura cellulare che contiene gli stessi fattori del MEM con l'aggiunta di un maggior quantitativo di vitamine e amminoacidi.

Il PBS o tampone solfato salino è una soluzione tampone che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato che serve per mantenere costante il pH delle cellule e dato che è isotonico e non tossico per le cellule viene utilizzato per il lavaggio delle cellule [13].

– RISULTATI

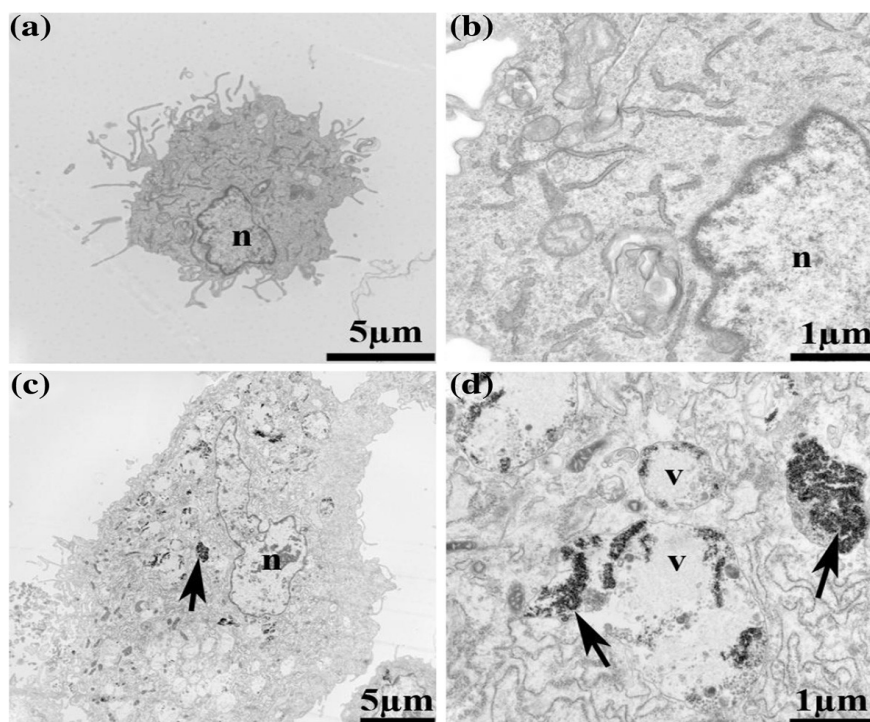


Figura 16: Immagine al TEM dell'assorbimento di DMSA-Fe₂O₃ [9]

Le nanoparticelle ricoperte con DMSA vengono assorbite facilmente dalle cellule che le disperdono nel citoplasma senza distruggere l'integrità della membrana cellulare. In Figura 16 sono presentate delle immagini ottenute con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule endoteliali aortiche poste in coltura con nanoparticelle ad una concentrazione di 0,02 mg/ml (Figura 16c e 16d) e di cellule che non hanno subito alcun tipo di trattamento (Figura 16a e 16b) [9].

Dallo studio che valuta gli effetti citotossici in funzione della dose di nanoparticelle risulta, come illustrato in Figura 17a, che per le cellule trattate con concentrazioni inferiori ai 0,05 mg/ml si ha una perdita di vitalità cellulare accettabile (il danno è inferiore al 20%), invece per dosi superiori si ha una perdita significativa di cellule; infatti, per esempio, nel caso di concentrazioni pari a 0,2 mg/ml la vitalità diminuisce fino a circa 56,7% [9].

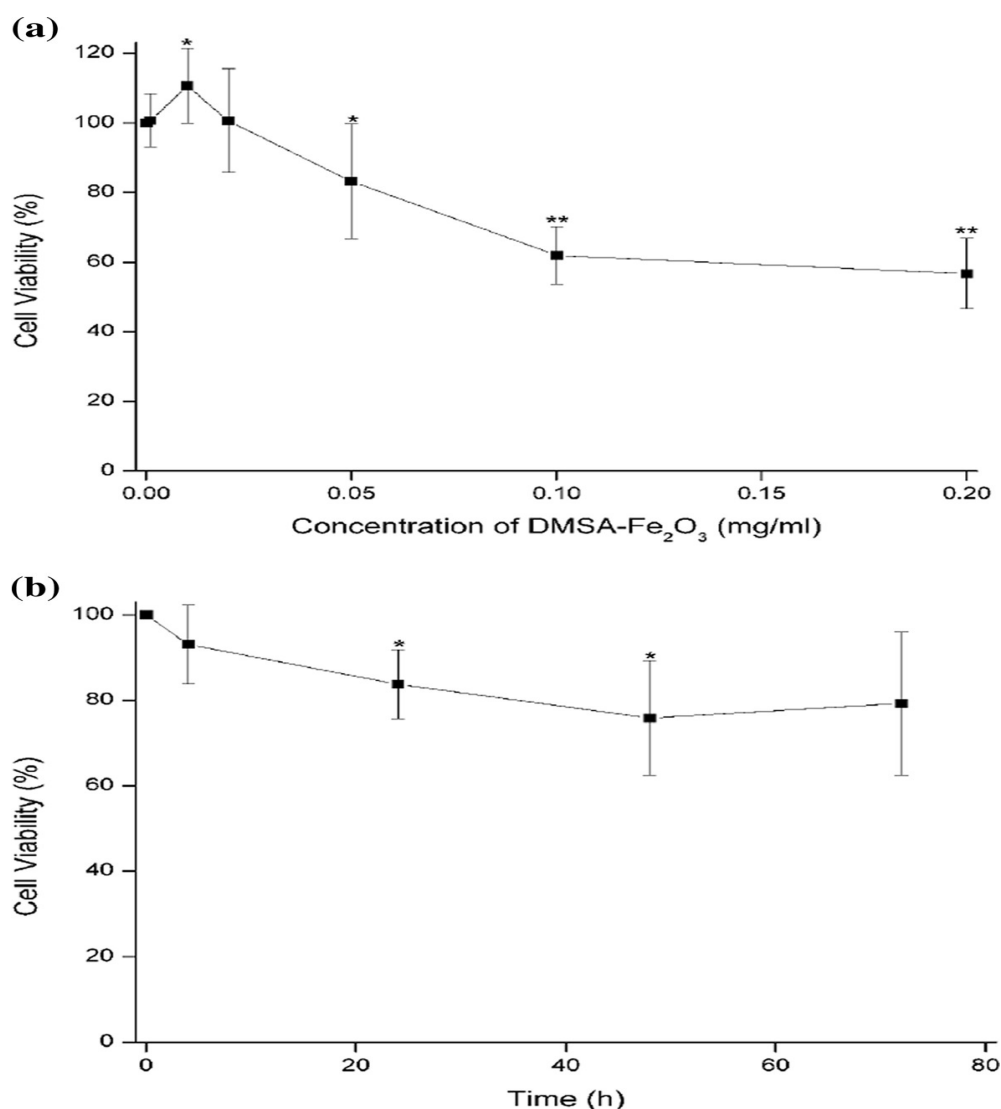


Figura 17: Vitalità delle cellule endoteliali in base alla concentrazione di DMSA-Fe₂O₃ (a) e in base al tempo di contatto(b) [9]

Dallo studio che valuta la citotossicità il funzione del tempo di contatto risulta, come illustrato in Figura 17b, che la vitalità cellulare decresce già dopo 4 ore e varia da una percentuale del 75,8 % al 93,1 % [9].

– CONCLUSIONI

Dallo studio appena descritto risulta che gli effetti citotossici delle nanoparticelle ricoperte da DMSA per cellule endoteliali aortiche umane sono dose-dipendenti, cioè all'aumentare della concentrazione aumenta la tossicità del composto. Infine concentrazioni di nanoparticelle inferiori o uguali a 0,02 mg/ml hanno effetti citotossici accettabili [9].

6.3 – CITOTOSSICITÀ DI NANOPARTICELLE PER CELLULE POLMONARI UMANE [11]

Lo studio in vitro per la valutazione della citotossicità di nanoparticelle effettuato su cellule di adenocarcinoma polmonare e su fibroblasti polmonari è stato condotto dall'istituto di ricerca sul cancro di Bratislava in collaborazione con l'istituto di virologia, l'università di Slovak e l'istituto di ingegneria elettrica di Bratislava. Di seguito viene descritto lo studio sopracitato.

– CAMPIONI DI NANOPARTICELLE UTILIZZATI

In questo studio vengono utilizzati tre tipi di nanoparticelle che presentano lo stesso nucleo Fe_3O_4 , delle dimensioni di 7,6 nm, ma diverso materiale di rivestimento. I materiali utilizzati per rivestire le particelle sono:

- Oleato di sodio ($\text{SO}^{17}\text{-Fe}_3\text{O}_4$);
- Oleato di sodio e glicole polietilenico ($\text{SO-PEG-Fe}_3\text{O}_4$);
- Oleato di sodio, glicole polietilenico e acido poli(lattico-co-glicolico) ($\text{SO-PEG-PLGA-Fe}_3\text{O}_4$).

In Tabella 5 vengono descritte le caratteristiche dei 3 tipi di nanoparticelle [11].

	$\text{SO-Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SO-PEG-Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SO-PEG-PLGA-Fe}_3\text{O}_4$
Dimensione particella	44 nm	76 nm	155 nm
Concentrazione di Fe_3O_4 per particella	134 mg/ml	100 mg/ml	13,7 mg/ml
Area superficiale per ciascuna nanoparticella	$6,079 \times 10^{-11} \text{ cm}^2$	$18,137 \times 10^{-11} \text{ cm}^2$	$75,439 \times 10^{-11} \text{ cm}^2$
Numero di nanoparticelle per ml	$1,13 \times 10^{17}$	$8,4 \times 10^{16}$	$1,15 \times 10^{16}$

Tabella 6: Caratteristiche delle NP con diverso rivestimento e stesso nucleo ferromagnetico

– CELLULE UTILIZZATE

Lo studio utilizza due tipi di cellule: una linea di cellule umane di adenocarcinoma polmonare, utilizzate come modello di tessuto cancerogeno, e una linea di fibroblasti polmonari umani, usati come modello di tessuto sano.

¹⁷ SO = acronimo per oleato di sodio.

Le cellule cancerogene sono state coltivate in DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino (FCS) e antibiotici. Invece i fibroblasti sono stati coltivati in MEM sempre con l'aggiunta di FCS e antibiotici [11].

– METODO UTILIZZATO PER VALUTARE LA VITALITÀ CELLULARE

Per valutare la citotossicità indotta dalle nanoparticelle possono essere utilizzati tre test:

- SAGGIO MTT;
- SAGGIO CON IL BLU TRIPANO (TB);
- SAGGIO LDH.

Il tre saggi vengono utilizzati per calcolare l' IC_{50} [11].

L' IC_{50} o concentrazione inibente è la concentrazione di un inibitore enzimatico necessaria ad inibire il 50% dell'attività metabolica della coltura in esame. La formula utilizzata per calcolare l' IC_{50} è [13]:

$$IC_{50} = \left[1 + \frac{Substrato}{K_m} \right] \cdot K_i$$

Dove:

- *Il Substrato è la massa (espressa in mM) della coltura cellulare sulla quale sono state applicate le nanoparticelle.*
- *K_i è l'affinità di legame dell'inibitore, definita come la capacità dell'inibitore di legarsi al composto in esame;*
- *K_m è la costante di Michealis-Menten;*

– RISULTATI

Per valutare se le nanoparticelle vengono assorbite dalle cellule in esame le cellule di adenocarcinoma e i fibroblasti vengono esposti a 0,3 mM di SO-PEG-Fe₃O₄ per 24 ore coltivati rispettivamente in DMEM e MEM e integrati con diverse concentrazioni di siero (0%, 2%, 5%, 10%). Al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) viene valutato se è avvenuta l'internalizzazione delle nanoparticelle all'interno delle cellule o meno e i risultati dimostrano che l'assorbimento di nanoparticelle dipende dalla concentrazione di siero nel mezzo di coltura; infatti nelle cellule trattate senza siero non sono state trovate nanoparticelle come si nota in Figura 18. Concentrazioni diverse di nanoparticelle si trovano all'aumentare del quantitativo di siero; un maggior numero di particelle magnetiche si trova nelle cellule coltivate con il 2% di FCS (Figura 19) rispetto a quelle coltivate con il 10% di FCS (Figura 20) [11].

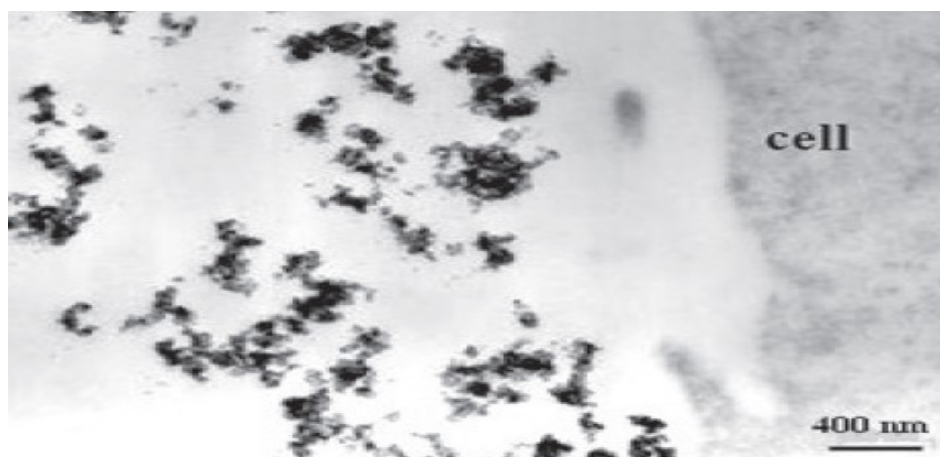


Figura 18: Cellule trattate con SO-PEG-Fe₃O₄ senza siero [11]

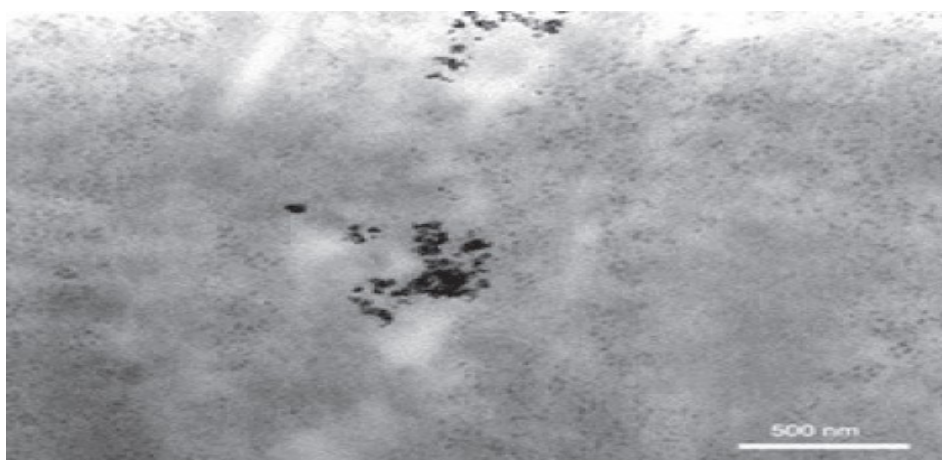


Figura 19: Cellule trattate con SO-PEG-Fe₃O₄ con 2% di siero [11]

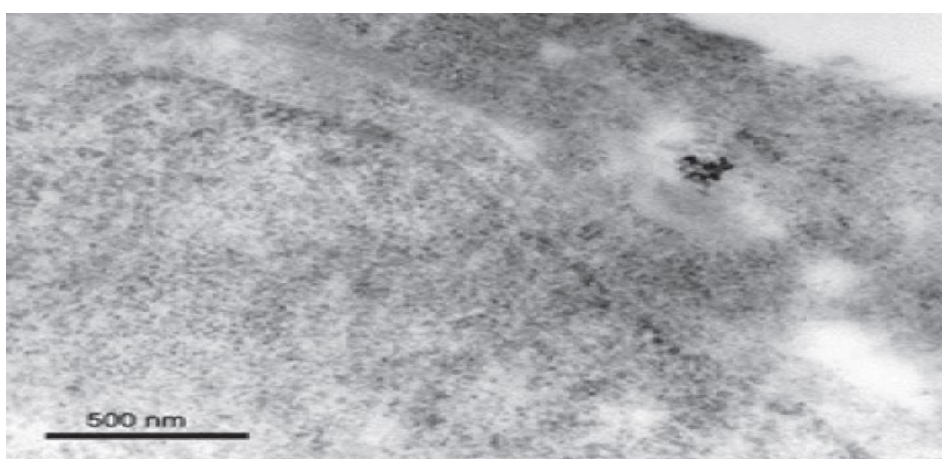


Figura 20: Cellule trattate con SO-PEG-Fe₃O₄ con 10% di siero [11]

Da questi risultati si deduce che l'internalizzazione delle nanoparticelle è favorita dalle proteine presenti nel siero e questi peptidi rendono l'assorbimento massimo a concentrazioni ben stabilite.

Per quanto riguarda il calcolo della citotossicità delle nanoparticelle per 100 mM di

cellule cancerogene e di fibroblasti messi a contatto con i tre tipi di magneto fluidi e con i soli composti polimerici, cioè solo con oleato di sodio, PEG e oleato di sodio più glicole polietilenico per 4 e 24 ore; poi viene calcolato l'IC₅₀ utilizzando tutti e tre i saggi citati precedentemente. I risultati ottenuti sono rappresentati in Tabella 7 [11].

		Cellule cancerogene		Fibroblasti polmonari	
Agente	Saggio	4 ore	24 ore	4 ore	24 ore
SO-Fe ₃ O ₄	MTT	5,726 mM ¹⁸	0,759 mM	0,820 mM	0,414 mM
	TB	1,321 mM	1,009 mM	n.i.	n.i.
	LDH	n.i. ¹⁹	n.i.	n.i.	n.i.
SO-PEG-Fe ₃ O ₄	MTT	1,183 mM	0,344 mM	0,593 mM	0,311 mM
	TB	0,933 mM	0,457 mM	n.i.	n.i.
	LDH	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
SO-PEG-PLGA-Fe ₃ O ₄	MTT	1,611 mM	0,184 mM	0,282 mM	0,129 mM
	TB	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	LDH	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
SO	MTT	0,725 mM	0,263 mM	n.i.	n.i.
	TB	0,415 mM	0,342 mM	n.i.	n.i.
	LDH	0,927 mM	0,209 mM	n.i.	n.i.
PEG	MTT	>0,125 mM	>0,125 mM	n.i.	n.i.
	TB	>0,125 mM	>0,125 mM	n.i.	n.i.
	LDH	>0,125 mM	>0,125 mM	n.i.	n.i.
SO+PEG	MTT	0,679 mM	0,192 mM	n.i.	n.i.
	TB	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	LDH	1,127 mM	0,253 mM	n.i.	n.i.

Tabella 7: Valori dell'IC₅₀ per diversi tipi di composti posti a contatto con cellule tumorali e sane [11]

Un primo risultato che si può ricavare dai dati riportati in Tabella 7 è il quantitativo di nanoparticelle necessario per inibire il 50% dell'attività metabolica delle cellule, infatti questo diminuisce all'aumentare del tempo di contatto delle cellule con le nanoparticelle. Lo stesso risultato lo si ottiene per le cellule cancerogene poste a contatto con il solo oleato di sodio e con l'oleato di sodio più il glicole polietilenico. Negli ultimi tre casi in Tabella 7 invece i risultati per i fibroblasti non sono pervenuti e per cellule cancerogene poste a contatto con il solo glicole polietilenico si riesce ad ottenere solo un limite inferiore ma non un dato certo. Infine da questi dati preliminari risulta che il saggio LDH e il saggio TB non sono molto utili per valutare la citotossicità delle nanoparticelle poiché risulta difficile distinguere le cellule

¹⁸ mM = millimole; la mole di una sostanza è la quantità di atomi o di molecole pari al peso atomico espresso in grammi

¹⁹ n.i. = non identificato

colorate con il blu tripano e quelle colorate dal fluido magnetico con cui vengono messe a contatto ed inoltre le nanoparticelle interferiscono con la spettrometria nel saggio LDH poiché anche loro emettono ad una lunghezza d'onda simile a quella della resorufina. Per questi motivi la citotossicità delle nanoparticelle viene valutata solo con il saggio MTT [11].

La citotossicità dei fluidi magnetici in funzione della concentrazione di nanoparticelle è stata valutata a 4 e 24 ore dalla somministrazione del composto variando la concentrazione da 0 a 3,2 mM. I risultati per ogni composto sono indicati in Figura 21, 22 e 23 dove A549 sono le cellule cancerogene e la HEL 12469 sono i fibroblasti polmonari sani [11].

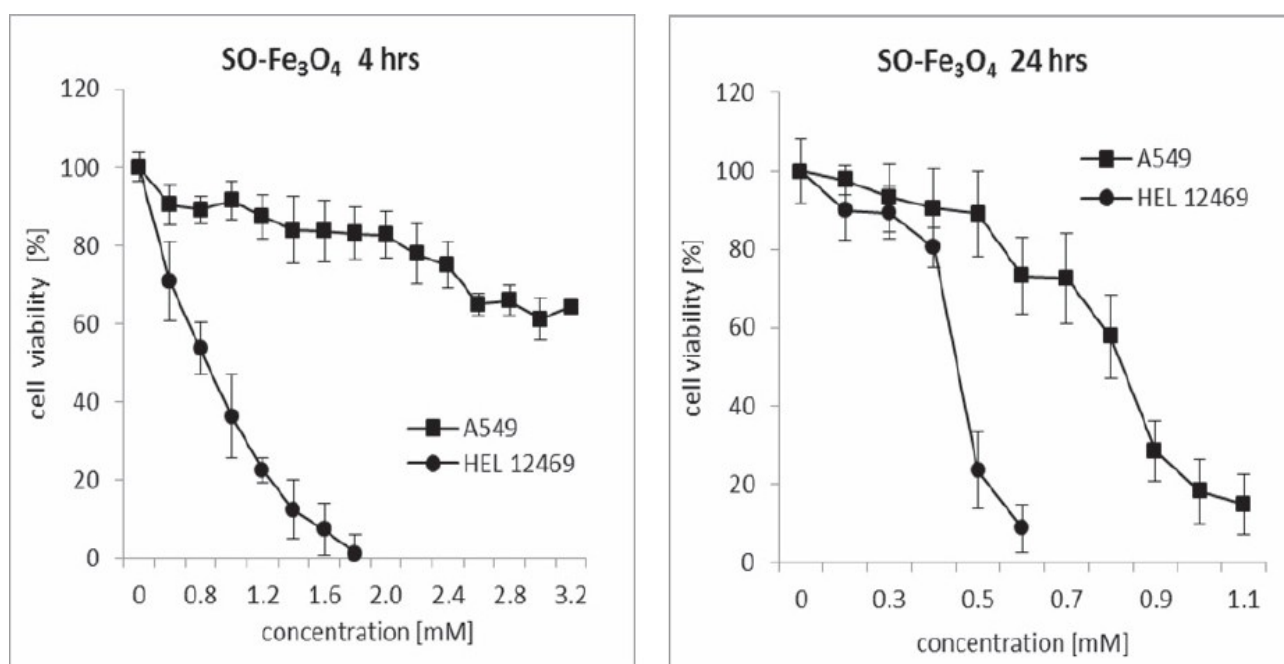


Figura 21: Citotossicità dell' $\text{SO-Fe}_3\text{O}_4$ in funzione della concentrazione. In ascissa si trova la concentrazione di nanoparticelle in mM e in ordinata la percentuale di vitalità cellulare [11]

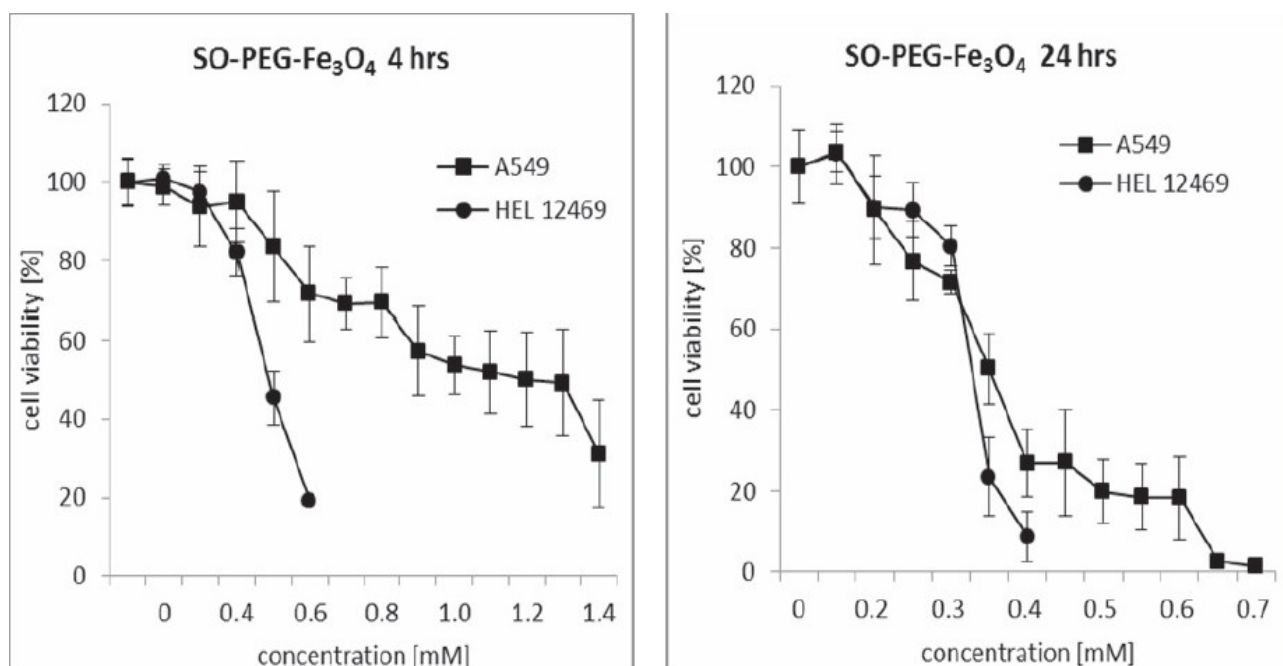


Figura 22: Citotossicità dell'SO-PEG-Fe₃O₄ in funzione della concentrazione. In ascissa si trova la concentrazione di nanoparticelle in mM e in ordinata la percentuale di vitalità cellulare [11]

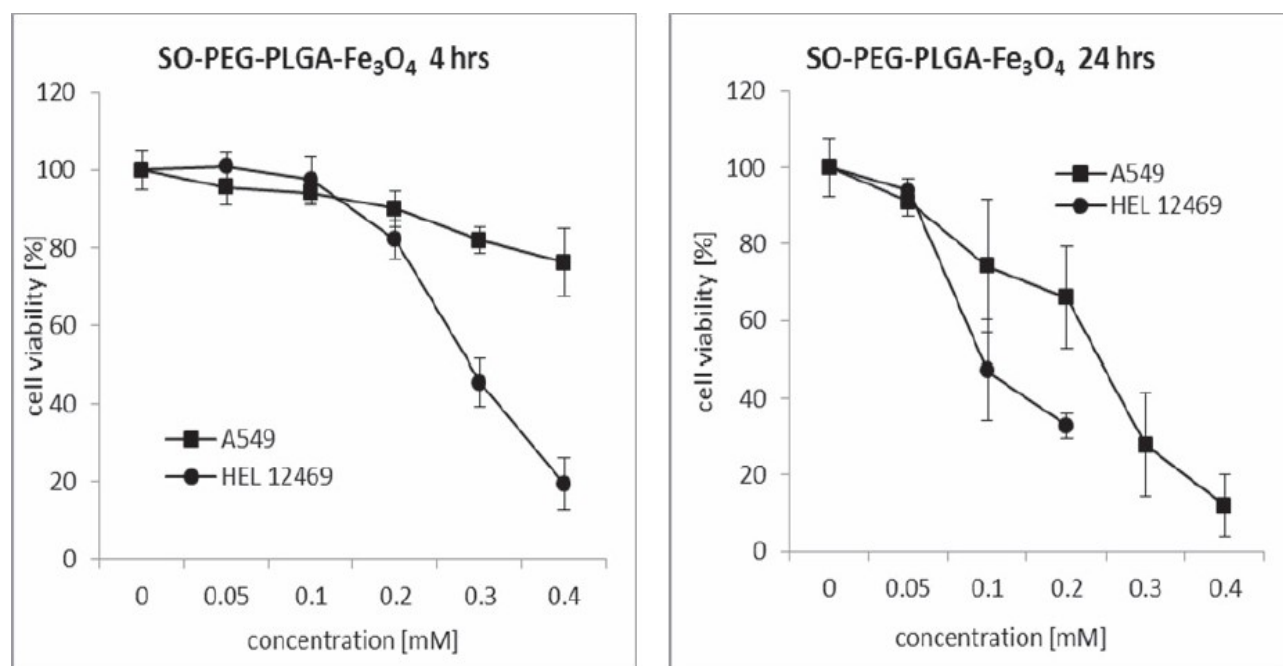


Figura 23: Citotossicità dell'SO-PEG-PLGA-Fe₃O₄ in funzione della concentrazione. In ascissa si trova la concentrazione di nanoparticelle in mM e in ordinata la percentuale di vitalità cellulare [11]

Dai risultati ottenuti si nota che la citotossicità delle nanoparticelle è dose-dipendente per entrambe le linee cellulari, cioè cresce all'aumentare della concentrazione del fluido magnetico ed inoltre le cellule sane sono più sensibili all'esposizione alle nanoparticelle rispetto alle cellule tumorali. In Tabella 8 viene descritto come cambiano i valori delle concentrazioni di nanoparticelle per uno stesso livello di

vitalità, nel caso di specie viene analizzato quando la vitalità è maggiore all'80% perché in fase sperimentale questo è il livello di vitalità che si può accettare [11].

TIPO DI CELLULE	TEMPO DI CONTATTO	CONCENTRAZIONE DI NANOPARTICELLE CHE RENDE LA VITALITÀ SUPERIORE ALL'80%		
		SOFe ₃ O ₄	SOPEG-Fe ₃ O ₄	SOPEG-PLGA-Fe ₃ O ₄
Cellule tumorali	4 ore	< 2 mM	< 0,5 mM	< 0,3 mM
Cellule tumorali	24 ore	< 0,5 mM	< 0,2 mM	< 0,05 mM
Cellule sane	4 ore	0 mM	< 0,4 mM	< 0,2 mM
Cellule sane	24 ore	< 0,4 mM	< 0,3 mM	< 0,05 mM

Tabella 8: Concentrazione di nanoparticelle che rendono la vitalità superiore all'80%

Per valutare la citotossicità delle nanoparticelle in funzione del tempo è stata valutata la vitalità cellulare 24 e 48 ore dopo il trattamento con i ferro fluidi a determinate concentrazioni. I risultati ottenuti sono rappresentati in Figura 24.

Da quanto descritto in Figura 24 si deduce che la citotossicità delle nanoparticelle è tempo-dipendente, cioè più le cellule restano a contatto con i fluidi magnetici più gli effetti tossici sono evidenti. In questo studio le concentrazioni dei tre ferro fluidi sono diverse per avere costante la superficie di contatto, infatti le nanoparticelle ricoperte da SO-PEG-PLGA sono più grandi delle particelle ricoperte da SO e SO-PEG perciò ne serve un quantitativo minore per avere la stessa superficie di contatto degli altri fluidi magnetici. Anche in questo caso risultano più sensibili agli effetti citotossici le cellule sane rispetto a quelle tumorali [11].

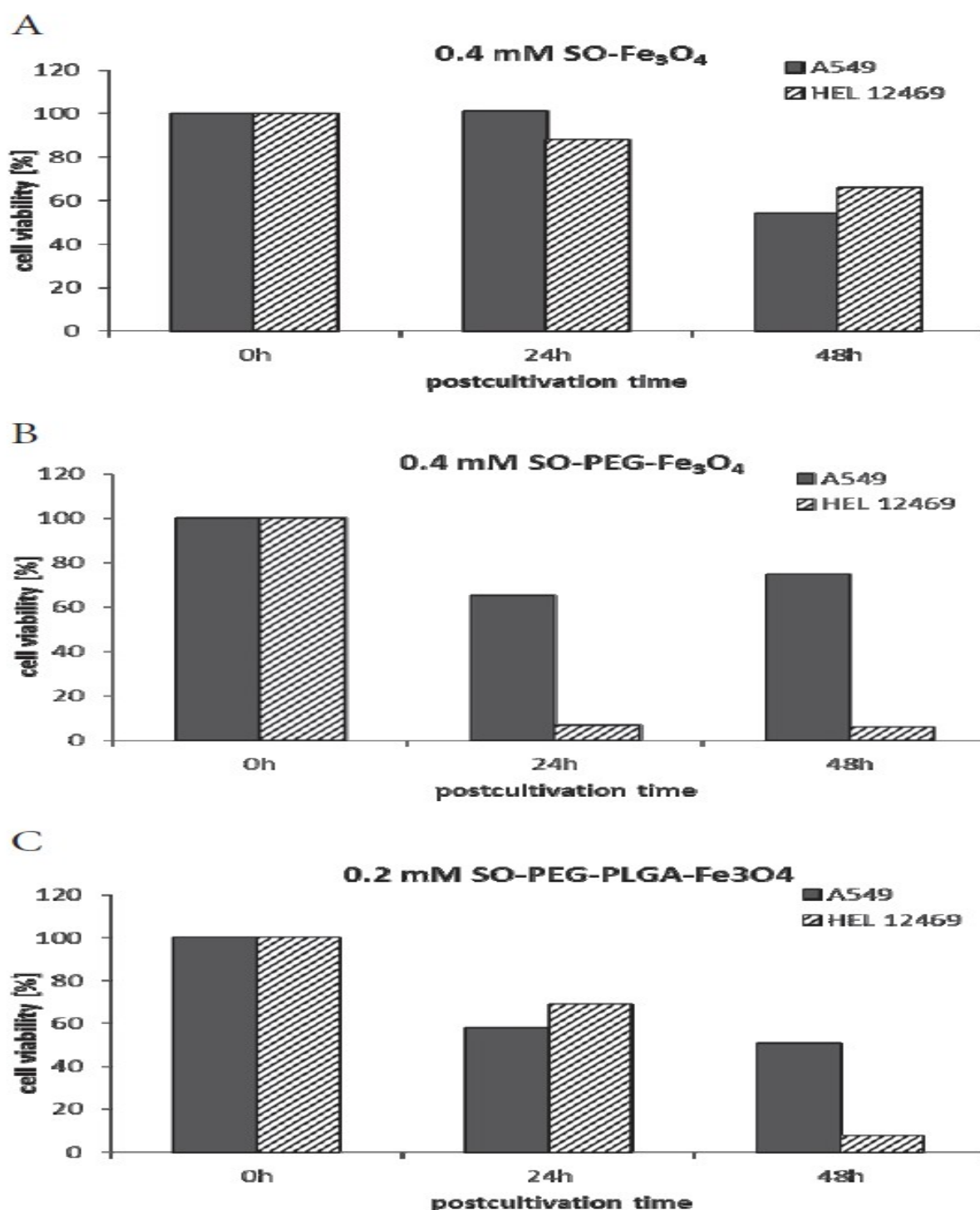


Figura 24: Citotossicità di fluidi magnetici per cellule polmonari 24 e 48 ore dopo il trattamento; (A) trattamento con 0,4 mM di SOFe₃O₄, (B) trattamento con 0,4 mM di SOPEG-Fe₃O₄, (C) trattamento con 0,2 mM di SOPEG-PLGA-Fe₃O₄ [11]

– CONCLUSIONI

Le nanoparticelle magnetiche vengono assorbite maggiormente dalle cellule in esame quando quest'ultime hanno un quantitativo di siero, nel mezzo di coltura pari al 2%. Perciò l'assorbimento di particelle è facilitato da alcune proteine presenti nell'FCS le

quali permettono la massima interiorizzazione di nanoparticelle da parte delle cellule a concentrazioni ben stabilite.

La citotossicità dei fluidi magnetici in esame risulta essere dose e tempo dipendente, cioè gli effetti tossici aumentano sia all'aumentare della concentrazione sia all'aumentare del tempo di contatto. Dai risultati ottenuti nello studio sopra esaminato risultano essere più sensibili agli effetti citotossici delle nanoparticelle le cellule polmonari sane rispetto alle tumorali [11].

Dai risultati sopra elencati la citotossicità è proporzionale anche alla grandezza delle nanoparticelle, infatti le nanoparticelle ricoperte da SO (più piccole) hanno effetti tossici meno marcati rispetto alle particelle ricoperte da SO-PEG e SO-PEG-PLGA (più grandi) questo perché le cellule riconoscono le nanoparticelle come agenti patogeni e tentano perciò di attaccarle però se gli agenti patogeni sono troppo grandi le cellule non sono in grado di degradarli e perciò si autodistruggono [11].

6.4 – CONFRONTO TRA GLI STUDI ANALIZZATI: ANALOGIE E DIFFERENZE

I terreni di coltura cellulari utilizzati nei tre studi sono diversi; le cellule di adenocarcinoma vengono coltivate in MEM, le cellule endoteliali vengono coltivate in DMEM invece l'ultimo studio analizzato utilizza il DMEM per le cellule cancerogene e il MEM per i fibroblasti polmonari (cellule sane).

La principale analogia presente in tutti e tre gli studi analizzati è l'utilizzo del saggio MTT per valutare la citotossicità dei diversi ferro fluidi utilizzati.

Nel primo e nel secondo studio viene analizzata la citotossicità di nanoparticelle ricoperte con tensioattivi invece nell'ultimo vengono analizzati gli effetti citotossici che presentano le nanoparticelle ricoperte con polimeri organici. Nello studio con cellule di adenocarcinoma vengono utilizzati tensioattivi sia a carica positiva che negativa invece nello studio con cellule endoteliali vengono utilizzate solo nanoparticelle ricoperte con DMSA, un tensioattivo a carica negativa. Dal primo studio risulta che i tensioattivi a carica positiva sono più tossici di quelli a carica negativa e che quest'ultimi danno effetti citotossici rilevanti se la concentrazione di nanoparticelle per cellula è maggiore di 2 ng ($\approx 0,02$ mg/ml) e/o se il tempo di contatto è maggiore di 24 ore. Dallo studio con cellule endoteliali risulta che effetti citotossici rilevanti si hanno se la concentrazione di nanoparticelle è superiore ai 0,05 mg/ml e/o il tempo di contatto è maggiore di 24 ore. In entrambi gli studi il tempo di contatto per avere citotossicità accettabile è minore o uguale a 24 ore ma la concentrazione di nanoparticelle è diversa ma questo è dovuto dal diverso tipo di cellule utilizzate. Lo studio su cellule polmonari è l'unico che indaga la citotossicità sia su cellule cancerogene che su cellule sane. Da questo studio risulta che gli effetti citotossici delle nanoparticelle sono più marcati sulle cellule sane rispetto a quelle cancerogene. Questi risultati però non possono essere comparati con gli altri due studi non solo perché vengono utilizzati diversi tipi di cellule ma anche perché vengono utilizzati diversi tipi di nanoparticelle.

STUDIO	CELLULE USATE	RIVESTIMENTO DELLE NP	SAGGIO DI CITOTOSSICITÀ	CONCENTRAZIONE MASSIMA DI NP	TEMPO MASSIMO DI CONTATTO
Primo	Adenocarcinoma mammario	Composti organici + tensioattivi a carica negativa	MTT	0,02 mg/ml	24 ore
		Composti organici + tensioattivi a carica positiva		0,002 mg/ml	24 ore
		Derivato dell'amido + tensioattivi a carica positiva		0,002 mg/ml	72 ore
		Nessuno		0,2 mg/ml	72 ore
Secondo	Endoteliali aortiche umane	DMSA	MTT	0,05 mg/ml	24 ore
Terzo	Cancerogene polmonari	SO	MTT	2 mM	4 ore
		SO+PEG		0,5 mM	24 ore
				0,5 mM	4 ore
				0,2 mM	24 ore
				0,3 mM	4 ore
		SO+PEG+PLGA		0,05 mM	24 ore
	Fibroblasti polmonari	SO	MTT	0 mM	4 ore
		SO+PEG		0,4 mM	24 ore
				0,4 mM	4 ore
				0,3 mM	24 ore
				0,2 mM	4 ore
		SO+PEG+PLGA		0,05 mM	24 ore

Tabella 9: Confronto tra i diversi studi analizzati.

7 – CONCLUSIONI

La tossicità delle nanoparticelle di ossido di ferro dipende da diversi fattori e cambia a seconda del sito d'applicazione previsto.

Il rapporto r , che è dato dal rapporto tra la massa del materiale di ricoprimento e la massa del nucleo di ferro, è un fattore importante da valutare per studiare la citotossicità. Se le nanoparticelle vengono poste direttamente a contatto con il tessuto da trattare all'aumentare di questo fattore diminuisce l'effetto tossico poiché si riducono i siti ossidativi della magnetite; se invece le nanoparticelle vengono iniettate per via endovenosa all'aumentare del rapporto aumenta la probabilità di attivazione del sistema del complemento. Per raggiungere un compromesso tra i due casi studi sperimentali hanno dimostrato che il rapporto ottimale è 3.

Il materiale con cui vengono rivestite le nanoparticelle influenza molto la capacità citotossica delle stesse poiché ne modifica la carica superficiale e le dimensioni. I rivestimenti con metalli inorganici, nonostante la loro buona biocompatibilità, non sono molto utili per i trattamenti di termoablazione poiché riducono le proprietà magnetiche delle nanoparticelle. I tensioattivi, sia a carica positiva che negativa, interagiscono favorevolmente con il mezzo acquoso però una volta interiorizzati dalle cellule quelli con carica positiva portano ad una maggiore ossidazione del DNA rispetto ai tensioattivi con carica negativa; entrambi però, a causa della carica superficiale, facilitano l'attivazione del sistema del complemento, l'aggregazione piastrinica e l'assorbimento da parte dei macrofagi. Oltre a quanto detto fino adesso i tensioattivi a carica positiva favoriscono anche l'emolisi. Il glicole polietilenico è il polimero maggiormente utilizzato poiché riduce i siti ossidativi della magnetite e limita l'emolisi, la trombogenicità, l'attivazione del sistema del complemento ed inoltre nanoparticelle ricoperte con PEG non vengono riconosciute dal sistema immunitario e perciò non vengono ricoperte da proteine plasmatiche e non vengono fagocitate dai macrofagi.

La forma delle nanoparticelle influenza la citotossicità e la risposta immunitaria in ambiente biologico. Infatti nanoparticelle con forme diverse hanno diversa superficie di contatto e diverso numero di siti ossidativi. Da alcuni studi sperimentali si è notato che la tossicità aumenta a seconda che le cellule entrino in contatto rispettivamente con nano perline, nano vermi o nanosfere; le nanosfere avendo una maggiore superficie di contatto hanno un maggior numero di siti ossidativi e perciò la probabilità di ossidare il DNA è maggiore rispetto alle nano perline e ai nano vermi.

Il diametro idrodinamico delle nanoparticelle influenza la citotossicità delle nanoparticelle infatti all'aumentare di quest'ultimo aumentano gli effetti citotossici perché le cariche dipolari presenti sulla superficie delle particelle attraggono i macrofagi ed interagiscono favorevolmente con il DNA cellulare lesionandolo. Inoltre la presenza di cariche dipolari, cioè positive e negative, porta alla rottura della membrana eritrocitica e perciò all'emolisi in ambiente biologico.

Infine anche le dimensioni delle nanoparticelle, ottenute sommando la dimensione del nucleo ferromagnetico e lo spessore del materiale di rivestimento, influenzano la

citotossicità. Più la dimensione della particella aumenta più facilmente viene fagocitata dai macrofagi e più facilmente si ha la formazione di trombi in ambiente biologico.

Da quanto osservato negli studi sperimentali su diversi tipi di cellule si nota che i comportamenti delle cellule al contatto con le nanoparticelle cambiano al variare del tipo di rivestimento delle cellule, dal tempo di contatto, dal quantitativo di nanoparticelle utilizzato e dal tipo di cellule in esame.

Nel caso di cellule di adenocarcinoma mammario le nanoparticelle ricoperte con tensioattivi a carica positiva sono altamente tossiche infatti una piccola percentuale di cellule sopravvivono al contatto con queste nanoparticelle, questo perché la carica superficiale delle particelle magnetiche ossida il DNA una volta interiorizzate dalle cellule ed inoltre interagiscono favorevolmente con le cariche negative presenti sulla superficie cellulare. Gli effetti citotossici di nanoparticelle con tensioattivi a carica negativa sono meno drastici però anche loro interagiscono con la membrana cellulare e il DNA portando così alla lisi cellulare. In questo studio l'unico tipo di nanoparticelle che hanno effetti citotossici accettabili sono quelle non rivestite e poiché gli effetti citotossici rilevati nelle altre nanoparticelle non sono limitabili alle sole cellule tumorali il solo campione utilizzabile è quello contenente nanoparticelle non rivestite.

Nel caso di cellule endoteliali aortiche umane i campioni cellulari vengono posti a contatto con nanoparticelle ricoperte con DMSA. Le particelle ricoperte con DMSA vengono interiorizzate facilmente dalle cellule senza alterare l'integrità della membrana cellulare è poiché il DMSA è un tensioattivo a carica negativa l'ossidazione del DNA è minima. Dallo studio risulta anche che la citotossicità aumenta all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle e del tempo di contatto con le particelle e che la concentrazione ideale di nanoparticelle deve essere minore o uguale a 0,02 mg/ml per un tempo di contatto di 24 ore.

Nel caso di cellule polmonari umane i campioni di cellule sane e tumorali vengono trattate con nanoparticelle ricoperte con tre tipi di rivestimento diversi. Le nanoparticelle ricoperte con oleato di sodio e glicole polietilenico vengono interiorizzate efficacemente dalle cellule solo se la concentrazione di siero è pari al 2% perché l'assorbimento è mediato da determinate concentrazioni di proteine presenti nel siero bovino. La citotossicità risulta essere dipendente dalla dose, dal tempo di contatto e dalle dimensioni delle nanoparticelle in esame infatti all'aumentare di questi fattori aumentano gli effetti citotossici. Le nanoparticelle che hanno effetti tossici accettabili per entrambe le colture cellulari a parità di superficie di contatto sono quelle ricoperte solamente da oleato di sodio; inoltre queste nanoparticelle provocano effetti citotossici a concentrazioni più alte rispetto agli altri due campioni.

8 – RIFERIMENTI

- [1] “Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico”; Carlo di Bello; Patron Editore 2004.
- [2] “Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles”; Sophie Laurent, Silvio Dutz, Urs O. Häfeli, Morteza Mahamoudi; Advances in Colloid and Interface Science 2011.
- [3] “Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles”; M. Mahamoudi, A. Simchi, A.S. Milani, P. Stroeve; Journal of Colloid And Interface Science 2009.
- [4] “Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy – feasibility, tolerance and achieved temperatures”; Peter Wust, Uwe Gneveckow, Manfred Johannsen, Dirk Böhmer, Thomas Henkel, Frank Kahmann, Jalid Sehouli, Roland Felix, Jens Rieke, Andreas Jordan; Int. F. Hyperthermia 2006.
- [5] “Preclinical Studies To Understand Nanoparticles Interaction with the Immune System and its Potential Effects on Nanoparticles Biodistribution”; Marina A. Dobrovolskaia, Parag Aggarwal, Jennifer B. Hall, Scott E. McNeil; Molecular Pharmaceutics 2008.
- [6] “Magnetic nanoparticles for theragnostic”; Veronica I. Shubayev, Thomas R. Pisanic II, Sungho Jin; Advanced Drug Delivery Reviews 2009.
- [7] “Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies”; Yue-Wern Huang, Chi-heng Wu, Robert R. Aronstam; Materials 2010.
- [8] “Citotoxicity of selected magnetic fluids on human adenocarcinoma cells”; Igrid Hilger, Sylvia Frühauf, Werner Linß, Robert Hiergeist, Wilfried Andrä, Rudolf Hergt, Werner A. Kaiser; Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2003.
- [9] “The cytotoxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles on human aortic endothelial cells”; Gaoyuan Ge, Hengfang Wu, Fei Xiong, Yu Zhang, Zhirui Guo, Zhiping Bian, Jindan Xu, Chunrong Gu, Ning Gu, Xiangjian Chen, Di Yang; Nanoscale Reserch Letters 2013.
- [10] “Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases”; Shirzad Azarmi, Wilson H. Roa, Raimar Löbenberg; Advanced Drug Delivery Reviews 2008.
- [11] “The intensity of internalization and cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with a different surface modifications in human tumor and diploid lung cells”; M. Mesarosova, F. Ciampor, V. Zavisova, M. Konercka, M. Ursinyova, K. Kozics, N. Tomasovicova, A. Hashim, I. Vavra, Z. Krizanova, Z. Hsekova, M. Kubovcikova, P. Kopcansky, M. Timko, A. Gabelova; Neoplasma 2012.
- [12] “Invito alla biologia”; Laura Gondola, Roberto Odone; Zanichelli 2003.
- [13] www.wikipedia.it.